



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Драгана З. Јаковљевић

ИНТРАСПЕЦИЈСКА ВАРИЈАБИЛНОСТ ПРИМАРНОГ И СЕКУНДАРНОГ
МЕТАБОЛИЗМА НУТРИТИВНО ДЕПРИВИРАНИХ КЛИЈАНАЦА ВРСТЕ

***Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae)**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2018. године

I. Аутор
Име и презиме: Драгана Јаковљевић
Датум и место рођења: 29.10.1986. године, Јагодина, Република Србија
Садашње запослење: асистент, Институт за биологију и екологију Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу
II. Докторска дисертација
Наслов: Интраспецијска варијабилност примарног и секундарног метаболизма нутритивно депривираних клијанаца врсте <i>Ocimum basilicum</i> L. (Lamiaceae)
Број страница: 175
Број слика: 20 слика, 31 табела, 36 графикона
Број библиографских података: 258
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Физиологија биљака (581.1)
Ментор: Проф. др Марина Топузовић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу
III. Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 26.04.2017. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-01-704/5 12.07.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: Др Марина Топузовић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Морфологија, фитохемија и систематика биљака; Др Биљана Бојовић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија биљака (председник комисије); Др Тијана Цветић Антић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, ужа научна област: Физиологија и молекуларна биологија биљака.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: Др Тијана Цветић Антић, ванредни професор Биолошког факултета, Универзитета у Београду, ужа научна област: Физиологија и молекуларна биологија биљака; Др Биљана Бојовић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија биљака (председник комисије); Др Милан Станковић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Морфологија, систематика и филогенија биљака.
Датум одбране докторске дисертације:

Експериментални део докторске дисертације спроведен је у Лабораторији за физиологију биљака Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета универзитета у Крагујевцу, као и у Департману за хемију, биохемију и заштиту животне средине Универзитета у Новом Саду. Захваљујем се менторки проф. др Марини Топузовић на изузетној отворености, сугестијама и смерницама током израде докторске дисертације. Велику захвалност дугујем доц. др Милану Станковићу за помоћ од првих лабораторијских, па до данашњих дана. На сарадњи у свакодневном раду, корисним саветима и сугестијама посебну захвалност дугујем доц. др Биљани Бојовић. Проф. др Тијани Цветић Антић се захваљујем на корисним саветима и сугестијама који су допринели квалитету ове докторске дисертације. Захвалност дугујем и Министарству просвете, науке и технолошког развоја на стипендирању током прве три године докторских студија. Неизмерно хвала мојој породици и мојим пријатељима на безграничној подршци.

Драгана Јаковљевић

САДРЖАЈ

УВОД	1
1. Таксономске и морфолошке карактеристике рода <i>Ocimum</i> L.	1
2. Опште карактеристике изабраних таксона	5
2.1. <i>Ocimum basilicum</i> L. var. <i>minimum</i> L.	5
2.2. <i>Ocimum basilicum</i> L. var. <i>basilicum</i> L.	6
2.3. <i>Ocimum basilicum</i> L. var. <i>purpurascens</i> Benth.	7
2.4. <i>Ocimum</i> x <i>citriodorum</i> Vis.	9
3. Активација и регулација примарног метаболизма током клијања семена	10
4. Асимилација неорганских компоненти и контрола примарног метаболизма	12
4.1. Асимилација угљеника	12
4.2. Асимилација азота	14
5. Синтеза протеина и пут шикимске киселине	16
5.1. Фенилпропаноидни метаболизам	19
6. Синтеза и уклањање реактивних врста кисеоника у примарном метаболизму.....	22
6.1. Ензимске компоненте антиоксидативне заштите	26
6.2. Не-ензимске компоненте антиоксидативне заштите	28
7. Примена културе ткива у проучавању босиљка	33
ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	35
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА	37
1. Идентификација биљног материјала	37
2. Дизајн експеримената	38
3. <i>In vitro</i> култура клијанаца	39
3.1. Састав хранљивих медијума	40
4. Испитивање карактеристика клијања	48
5. Спектрофотометријска квантификација концентрације фотосинтетичких пигмената	49
6. Екстракција и спектрофотометријска квантификација укупних солубилних протеина ..	49
7. Испитивање ензимских компоненти одбрамбеног система	50

7.1.	Квантификација активности супероксид дисмутаза	50
7.2.	Квантификација активности каталазе	51
7.3.	Квантификација активности аскорбат пероксидазе	51
7.4.	Квантификација активности гвајакол пероксидазе	52
7.5.	Квантификација активности пирогалол пероксидазе	53
8.	Екстракција и одређивање активности фенилаланин амонијум лиаза	54
9.	Квантитативна анализа секундарних метаболита	55
9.1.	Узорковање и припрема биљног материјала	55
9.2.	Одређивање количине укупних фенолних једињења	55
9.3.	Одређивање количине флавоноида	56
10.	Испитивање укупне антиоксидативне активности	56
11.	Квалитативна анализа секундарних метаболита	57
12.	Статистичка обрада података	58
	РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	59
I	Ефекат пролонгираног соног стреса на физиолошке и биохемијске карактеристике клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у <i>in vitro</i> условима	59
1.	Ефекат пролонгираног соног стреса на растење и развиће клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i>	59
2.	Физиолошки одговор клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> на сони стрес	62
II	Физиолошки одговор клијанаца различитих генотипова босиљка на пролонгирани нутритивни стрес	70
1.	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i>	70
1.1.	Карактеристике клијања	70
1.2.	Концентрација фотосинтетичких пигмената	71
1.3.	Концентрација укупних солубилних протеина	73
1.4.	Активност ензимских компоненти одбрамбеног система	74
1.4.1.	Активност супероксид дисмутаза	74
1.4.2.	Активност каталазе	75
1.4.3.	Активност аскорбат пероксидазе	76
1.4.4.	Активност гвајакол пероксидазе	77
1.4.5.	Активност пирогалол пероксидазе	78
1.5.	Активност фенилаланин амонијум лиаза	79

1.6.	Не-ензимске компоненте одбрамбеног система	80
1.6.1.	Количина укупних фенолних једињења	80
1.6.2.	Количина флавоноида	81
1.7.	Укупна антиоксидативна активност	81
1.8.	Концентрација рузмаринске и кофеинске киселине	82
2.	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. <i>Genovese</i>	84
2.1.	Карактеристике клијања	84
2.2.	Концентрација фотосинтетичких пигмената	85
2.3.	Концентрација укупних солубилних протеина	87
2.4.	Квантификација активности ензимских компоненти одбрамбеног система.....	88
2.4.1.	Активност супероксид дисмутазе	88
2.4.2.	Активност каталазе	89
2.4.3.	Активност аскорбат пероксидазе	90
2.4.4.	Активност гвајакол пероксидазе	91
2.4.5.	Активност пирогалол пероксидазе	92
2.5.	Активност фенилаланин амонијум лиазае	93
2.6.	Не-ензимске компоненте одбрамбеног система	94
2.6.1.	Количина укупних фенолних једињења	94
2.6.2.	Количина флавоноида	95
2.7.	Укупна антиоксидативна активност	95
2.8.	Концентрација рузмаринске и кофеинске киселине	96
3.	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. <i>Dark Opal</i>	98
3.1.	Карактеристике клијања	98
3.2.	Концентрација фотосинтетичких пигмената	99
3.3.	Концентрација укупних солубилних протеина	101
3.4.	Активност ензимских компоненти одбрамбеног система	102
3.4.1.	Активност супероксид дисмутазе	102
3.4.2.	Активност каталазе	103
3.4.3.	Активност аскорбат пероксидазе	104
3.4.4.	Активност гвајакол пероксидазе	105
3.4.5.	Активност пирогалол пероксидазе	106

3.5.	Активност фенилаланин амонијум лиазе	107
3.6.	Не-ензимске компоненте одбрамбеног система	108
3.6.1.	Количина укупних фенолних једињења	108
3.6.2.	Количина флавоноида	109
3.7.	Укупна антиоксидативна активност	109
3.8.	Концентрација рузмаринске и кофеинске киселине	110
4.	<i>Ocimum x citriodorum</i>	112
4.1.	Карактеристике клијања	112
4.2.	Концентрација фотосинтетичких пигмената	113
4.3.	Концентрација укупних солубилних протеина	115
4.4.	Активност ензимских компоненти одбрамбеног система	116
4.4.1.	Активност супероксид дисмутазе	116
4.4.2.	Активност каталазе	117
4.4.3.	Активност аскорбат пероксидазе	118
4.4.4.	Активност гвајакол пероксидазе	119
4.4.5.	Активност пирогалол пероксидазе	120
4.5.	Активност фенилаланин амонијум лиазе	121
4.6.	Не-ензимске компоненте одбрамбеног система	122
4.6.1.	Количина укупних фенолних једињења	122
4.6.2.	Количина флавоноида	123
4.7.	Укупна антиоксидативна активност	123
4.8.	Концентрација рузмаринске и кофеинске киселине	124
	ДИСКУСИЈА	126
	ЗАКЉУЧЦИ	145
	ЛИТЕРАТУРА	149
	ПРИЛОЗИ	174

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

$^1\text{O}_2$ – синглет кисеоник
 $^3\text{O}_2$ – триплет кисеоник
3-PGA – трифосфоглицеринска киселина
4CL – 4-кумароил коензим A-лигаза
A-POX – аскорбат пероксидаза
Arg – аргинин
AsA – аскорбинска киселина
ATP – аденозин 3-фосфат
BSA – (*eng. bovine serum albumin*) говеђи серум албумин
C4H – цинамат 4-хидроксилаза
CAT – каталаза
CAT1, CAT2, CAT3 – изоформе каталазе
CoA – коензим A
Cu/Zn-SOD – бакар/цинк супероксид дисмутаза
Cys – цистеин
DAHP – 3-дезоксид-Д-хептулозо-7-фосфат
DAP – дихидроксиацетон фосфат
DHA – дехидроаскорбат
DHAR – дехидроаскорбат редуктаза
DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил
DUS тест – (*eng. Distinctiveness, Uniformity and Stability test*) тест особености, униформности и стабилности
E4-P – еритроза 4-фосфат
EDTA – етилендиаминотетракарбоксична киселина
EPSP – 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат
ETC – електрон-транспортни ланац
 ϵ – моларни екстинкцијски коефицијент
Fe-SOD – гвожђе супероксид дисмутаза
F6-P – фруктоза 6-фосфат
GAE – еквивалент галне киселине
GAP – глицералдехид 3-фосфат
Glu – глутамин
GLU1, GLU2 – (*eng. glucosidase genes*) гени за глюкозидазу
GP – (*eng. germination percentage*) проценат клијања
G-POX – гвајакол пероксидаза
GR – глутатион редуктаза
GS – глутаминска синтетаза
GSH – редуковани глутатион
GSSG – глутамин-оксоглутарат-аминотрансфераза
GSSG – глутатион дисулфид
 H_2O_2 – водоник-пероксид
HATS – (*eng. high affinity transport system*) транспортни систем високог афинитета
His – хистидин
 HNO_3 – азотна киселина
HPPR – 4-хидрокси-фенилпируват редуктаза
kDa – килодалтон
 KNO_3 – калијум нитрат
LATS – (*eng. low affinity transport system*) транспортни систем ниског афинитета
Leu – леуцин
Lys – лизин
MDA – малондиалдехид
MDHA – монодихидроаскорбат
MDHAR – монодехидроаскорбат редуктаза
Met – метионин

Mn-SOD – манган супероксид дисмутаза
 mRNK – (*eng. messenger RNK*) информациона RNK
 MTG – (*eng. mean time to germination*) средње време клијања
 NADPH – никотинамид аденин динуклеотид фосфат
 NaOCl – натријум хипохлорит
 NBT – (*eng. nitro-blue tetrazolium*) нитро плаво тетразолијум хлорид
 NH_4^+ – амонијумов јон
 NH_4NO_3 – амонијум нитрат
 NIA, NII – (*eng. nitrate reductase genes*) гени за нитратну редуктазу
 NO_3^- – нитратни јон
 NRT1 – (*eng. nitrate transporter gene 1*) нитратни транспортер ген 1
 NRT2 – (*eng. nitrate transporter gene 2*) нитратни транспортер ген 2
 O_2^- – супероксид анјон-радикал
 PAL – фенилаланин амонијум лиаза
 PAL1, PAL2, PAL3, PAL4 – (*eng. phenylalanine ammonia lyase genes*) гени за фенилаланин амонијум лиазу
 PEP – фосфоенолпируват
 PET – фотосинтетички електрон-транспортни ланац
 Phe – фенилаланин
 pHPP – 4-хидрокси-фенилпируват
 P_i – фосфат
 P-POX – пирогалол пероксидаза
 PSI – фотосистем I
 PSII – фотосистем II
 PVP – поливинилпиролидин
 RAS – синтаза рузмаринске киселине
 RG – (*eng. rate of germination*) брзина клијања
 RNS – реактивне врсте азота
 ROS – реактивне врсте кисеоника
 rpm – (*eng. rotations per minute*) ротације по минути
 Rubisco – рибулоза 1,5-бисфосфат карбоксилаза/оксигеназа
 RubP – рибулоза 1,5-бисфосфат
 RUE – еквивалент рутине
 SOD – супероксид дисмутаза
 SRM – (*eng. selected reactions monitoring*) праћење одабраног фрагмента
 TAL – тирозин амонијум лиаза
 TAT – тирозин аминокиселин-трансфераза
 TCA – циклус трикарбонских киселина
 TK – транскетолаза
 TPT – триозофосфатни транслокатори
 Trp – триптофан
 Tyr – тирозин
 U – униформност клијања
 UPOV – Међународна Унија за заштиту нових биљних sorti
 MS – Murashige-Skoog медијум
 UQ – убиквинон
 Val – валин
 W-W – циклус вода-вода
 XOD – ксантин-оксидаза
 Xyl 5-P – ксилулоза 5-фосфат
 $\text{OH}^\cdot$ – хидроксил-радикал

ЛИСТА СЛИКА

Слика 1.	Грађа изданка, цвета и плода представника рода <i>Ocimum</i> L.	2
Слика 2.	Таксономски положај различитих врста и варијетета босиљка у зависности од величине генома и броја хромозома	4
Слика 3.	Хабитус <i>Ocimum basilicum</i> L. var. <i>minimum</i> L.	5
Слика 4.	Хабитус <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese	6
Слика 5.	Хабитус <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal	7
Слика 6.	Локација антоцијанина у епидермалним ћелијама стабла (E), у ћелијама цветне ложе (P) и вакуолама нежлезданих трихома (V)	8
Слика 7.	Хабитус <i>Ocimum</i> x <i>citriodorum</i> Vis.	9
Слика 8.	Пут шикимске киселине	18
Слика 9.	Различити продукти фенилпропаноидог метаболизма	21
Слика 10.	Производња реактивних врста кисеоника и њихова елиминација током процеса фотосинтезе	23
Слика 11.	Општа структурна формула флавоноида	29
Слика 12.	Структурна формула кофеинске киселине	30
Слика 13.	Структурна формула рузмариинске киселине	31
Слика 14.	Редукција NBT (<i>nitro-blue tetrazolium</i>) и формирање формазана	50
Слика 15.	Редукција водоник-пероксида и оксидација аскорбинске киселине до дехидроаскорбинске киселине посредством аскорбат пероксидазе	51
Слика 16.	Редукција водоник-пероксида и оксидација гвајакола у тетрагвајакол посредством гвајакол пероксидазе	52
Слика 17.	Редукција водоник-пероксида и оксидација пирогалола до пурпурогалина посредством пирогалол пероксидазе	53
Слика 18.	Деаминација аминокиселине фенилаланин посредством PAL ензима и настајање <i>trans</i> -циметне киселине уз ослобађање амонијума	54
Слика 19.	Настајање металокомплекса у реакцији флавоноида и метала	56
Слика 20.	Реакција преласка радикалске 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил форме у нерадикалску форму 1,1-дифенил-2-(2,4,6-тринитрофенил)-хидразина	57

ЛИСТА ТАБЕЛА

Табела 1.	Састав хранљиве подлоге по Murashige и Skoog-у (1962)	41
Табела 2.	Састав третмана 1a	42
Табела 3.	Састав третмана 2a	43
Табела 4.	Састав третмана 3a	44
Табела 5.	Састав третмана 1b	45
Табела 6.	Састав третмана 2b	46
Табела 7.	Састав третмана 3b	47
Табела 8.	Оптимизовани параметри SRM одређивања	58
Табела 9.	Свежа маса (g) клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајених у медијумима са различитим концентрацијама натријум хлорида током првог месеца у култури <i>in vitro</i>	59
Табела 10.	Дужина изданака (mm) клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајених у медијумима са различитим концентрацијама натријум хлорида током 28 дана у култури <i>in vitro</i>	60
Табела 11.	Дужина корена (mm) клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајених на медијумима са различитим концентрацијама натријум хлорида током првог месеца у култури <i>in vitro</i>	61
Табела 12.	Карактеристике клијања семена генотипа <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота	70
Табела 13.	Концентрација хлорофила <i>a</i> , хлорофила <i>b</i> , однос хлорофила <i>a/b</i> и концентрација каротеноида (mg g ⁻¹ SM) у свежим листовима клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота	71
Табела 14.	Концентрација укупних солубилних протеина (mg g ⁻¹ SM) у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у зависности од количине и типа нутријената	73
Табела 15.	Количина укупних фенолних једињења, количина флавоноида и укупна антиоксидативна активност у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у зависности од количине и типа нутријената	80
Табела 16.	Концентрација рузмариנסке и кофеинске киселине у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у зависности од количине и типа нутријената	82
Табела 17.	Карактеристике клијања семена генотипа <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота	84
Табела 18.	Концентрација хлорофила <i>a</i> , хлорофила <i>b</i> , однос хлорофила <i>a/b</i> и концентрација каротеноида (mg g ⁻¹ SM) у свежим листовима клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота	85
Табела 19.	Концентрација укупних солубилних протеина (mg g ⁻¹ SM) у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената	87
Табела 20.	Количина укупних фенолних једињења, количина флавоноида и укупна антиоксидативна активност у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената	94
Табела 21.	Концентрација рузмариנסке и кофеинске киселине у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената	96
Табела 22.	Карактеристике клијања семена генотипа <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота	98
Табела 23.	Концентрација хлорофила <i>a</i> , хлорофила <i>b</i> , однос хлорофила <i>a/b</i> и концентрација каротеноида (mg g ⁻¹ SM) у свежим листовима клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота	99

Табела 24.	Концентрација укупних солубилних протеина (mg g^{-1} SM) у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената ...	101
Табела 25.	Количина укупних фенолних једињења, количина флавоноида и укупна антиоксидативна активност у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената	108
Табела 26.	Концентрација рузмариנסке и кофеинске киселине у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената	110
Табела 27.	Карактеристике клијања семена генотипа <i>Ocimum</i> x <i>citriodorum</i> при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота	112
Табела 28.	Концентрација хлорофила <i>a</i> , хлорофила <i>b</i> , однос хлорофила <i>a/b</i> и концентрација каротеноида (mg g^{-1} SM) у свежим листовима клијанаца <i>Ocimum</i> x <i>citriodorum</i> при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота	113
Табела 29.	Концентрација укупних солубилних протеина (mg g^{-1} SM) у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum</i> x <i>citriodorum</i> у зависности од количине и типа нутријената	115
Табела 30.	Количина укупних фенолних једињења, количина флавоноида и укупна антиоксидативна активност у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum</i> x <i>citriodorum</i> Opal у зависности од количине и типа нутријената	122
Табела 31.	Концентрација рузмариנסке и кофеинске киселине у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum</i> x <i>citriodorum</i> у зависности од количине и типа нутријената	124

ЛИСТА ГРАФИКОНА

Графикон 1.	Активност супероксид дисмутазе у изданицима клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури <i>in vitro</i>	62
Графикон 2.	Активност супероксид дисмутазе у корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури <i>in vitro</i>	63
Графикон 3.	Активност каталазе у изданицима клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури <i>in vitro</i>	64
Графикон 4.	Активност каталазе у корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури <i>in vitro</i>	65
Графикон 5.	Активност пирогалол пероксидазе у изданицима клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури <i>in vitro</i>	66
Графикон 6.	Активност пирогалол пероксидазе у корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури <i>in vitro</i>	67
Графикон 7.	Активност гвајакол пероксидазе у изданицима клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури <i>in vitro</i>	68
Графикон 8.	Активност гвајакол пероксидазе у корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> гајеног на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури <i>in vitro</i>	69
Графикон 9.	Количина укупног хлорофила у свежим листовима клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у зависности од количине и типа нутријената	72
Графикон 10.	Активност супероксид дисмутазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у зависности од количине и типа нутријената	74
Графикон 11.	Активност каталазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у зависности од количине и типа нутријената	75
Графикон 12.	Активност аскорбат пероксидазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у зависности од количине и типа нутријената	76
Графикон 13.	Активност гвајакол пероксидазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у зависности од количине и типа нутријената	77
Графикон 14.	Активност пирогалол пероксидазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у зависности од количине и типа нутријената	78
Графикон 15.	Активност фенилаланин амонијум лиазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i> у зависности од количине и типа нутријената	79
Графикон 16.	Количина укупног хлорофила у свежим листовима клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената	86
Графикон 17.	Активност супероксид дисмутазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената	88
Графикон 18.	Активност каталазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената	89
Графикон 19.	Активност аскорбат пероксидазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената	90
Графикон 20.	Активност гвајакол пероксидазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената	91
Графикон 21.	Активност пирогалол пероксидазе у изданицима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената	92

Графикон 22.	Активност фенилаланин амонијум лиаза у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>basilicum</i> cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената	93
Графикон 23.	Количина укупног хлорофила у свежим листовима клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената.....	100
Графикон 24.	Активност супероксид дисмутаза у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената	102
Графикон 25.	Активност каталазе у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената	103
Графикон 26.	Активност аскорбат пероксидазе у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената	104
Графикон 27.	Активност гвајакол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената	105
Графикон 28.	Активност пирогалол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената	106
Графикон 29.	Активност фенилаланин амонијум лиаза у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената	107
Графикон 30.	Количина укупног хлорофила у свежим листовима клијанаца <i>Ocimum x citriodorum</i> у зависности од количине и типа нутријената	114
Графикон 31.	Активност супероксид дисмутаза у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum x citriodorum</i> у зависности од количине и типа нутријената	116
Графикон 32.	Активност каталазе у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum x citriodorum</i> у зависности од количине и типа нутријената	117
Графикон 33.	Активност аскорбат пероксидазе у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum x citriodorum</i> у зависности од количине и типа нутријената	118
Графикон 34.	Активност гвајакол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum x citriodorum</i> у зависности од количине и типа нутријената	119
Графикон 35.	Активност пирогалол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum x citriodorum</i> у зависности од количине и типа нутријената	120
Графикон 36.	Активност фенилаланин амонијум лиаза у изданцима и корену клијанаца <i>Ocimum x citriodorum</i> у зависности од количине и типа нутријената	121

ИЗВОД

Ocimum basilicum L. (босиљак) је међу најчешће култивисаним биљним врстама, пре свега због нутритивних и фармаколошких својстава. Дугогодишња култивација и конвенционална употреба ове врсте довели су до значајних варирања у погледу квантитативно-квалитативних карактеристика различитих генотипова, па квалитет сорти босиљка варира, не само због генетички условљених разлика, већ и због фактора спољашње средине. Најважнији процеси растења и развића биљака у тесној су везани са количином доступних нутријената, нарочито при најранијим ступњевима. Међутим, у процесу култивације, више пажње се посвећује продуктивности, а мање доступности нутријената и њиховој употреби од стране биљке. Разумевање деловања нутритивних фактора кроз испитивање одговора различитих генотипова на исте услове стреса може дати увид у степен интраспецијских разлика унутрашњег, физиолошког одговора јувенилних биљних организама. Предмет спроведених истраживања су различити генотипови босиљка (*Ocimum basilicum* L. var. *basilicum* L., *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* L., *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth. и *Ocimum* x *citriodorum* Vis. (фамилија Lamiaceae)). Спроведена истраживања имала су следеће циљеве: увођење одабраних генотипова у *in vitro* услове и формирање система за праћење физиолошких и биохемијских промена током растења и развића кроз успостављање културе клијанаца; утврђивање деловања количине доступних нутријената и форме доступног азота на карактеристике клијања и примарни метаболизам одабраних генотипова; утврђивање интраспецијских разлика у физиолошким одговорима на оксидативни стрес изазван нутритивном депривацијом; испитивање путева синтезе секундарних метаболита и степена повезаности примарног и секундарног метаболизма босиљка у условима нутритивне депривације; одређивање интраспецијске варијабилности у количини укупних фенолних једињења, количини флавоноида и укупној антиоксидативној активности услед стреса изазваног нутритивном депривацијом; утврђивање квалитативних разлика у продукцији најзаступљенијих биоактивних једињења у биљном материјалу квантификацијом одабраних секундарних метаболита и дефинисање прецизних нутритивних захтева појединачних генотипова. Први део експерименталних истраживања је подразумевао увођење одабраних представника босиљка у *in vitro* услове, а након тога и успостављање културе клијанаца као система за праћење физиолошких одговора босиљка. Друга група експеримената обухватала је испитивање утицаја квантитативног и квалитативног састава минералне исхране на физиолошке одговоре клијанаца различитих генотипова босиљка у *in vitro* условима. Третмани су укључивали различите концентрације минералних елемената (ниске, умерене и високе концентрације) са KNO_3 као главним извором азота, као и различите

концентрације минералних елемената, али са KNO_3 и NH_4NO_3 као изворима азота. Као резултат истраживања успешно су развијени протоколи и поуздано је успостављена *in vitro* култура клијанаца за четири генотипа босиљка: *Ocimum basilicum* var. *basilicum*, *Ocimum basilicum* var. *minimum*, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* и *Ocimum* x *citriodorum*. Утврђено је да присуство амонијачне форме азота умањује способност семена да клијају код свих испитиваних генотипова, при чему су нутритивни захтеви у погледу клијања семена генотипски специфични. Испитивањем обима примарних метаболичких процеса кроз утврђивање концентрација структурних компоненти, добијени су резултати који указују на потребу генотипски индивидуализоване минералне исхране у циљу постизања максималних резултата у продуктивности и експлоатацији економски важних биљних представника. Анализирањем активности ензимских компоненти одбрамбеног антиоксидативног система наведених генотипова добијени су резултати који указују на постојање интраспецијских разлика у активности ензима и њиховој корелацији при стресним условима, при чему је исхрана базирана на амонијумовим јонима додатни стресни фактор. Додатно, разлике су уочљиве и у односу на испитиване биљне делове истог генотипа. Подземни органи испитиваних генотипова испољили су, у условима умереног нутритивног стреса, високу концентрацију фенолних једињења, као и високу антиоксидативну активност у поређењу са надземним деловима. Испитивање активности фенилаланин амонијум лиазае, кључног ензима на прелазу између примарног и секундарног метаболизма, представља значајан допринос расветљавању путева синтезе секундарних метаболита. У условима *in vitro*, који су дефинисани у овом истраживању за сваки од испитиваних генотипова, у кратком временском интервалу квантификована је значајно висока концентрација рузмаринске и кофеинске киселине – фенолних киселина са све значајнијом употребом. Показано је да је култура клијанаца погодан систем који у контролисаним условима омогућава како проучавање комплексних карактеристика јувенилног периода, тако и проучавање раних физиолошких одговора биљних организама на деловање појединачних фактора. Додатно, *in vitro* култура клијанаца босиљка омогућава продукцију метаболита у високим концентрацијама. Механизми превазилажења пролонгираног нутритивног стреса током јувенилне фазе клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum*, *Ocimum basilicum* var. *minimum*, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* и *Ocimum* x *citriodorum* су генотипски специфични. Контролисани услови и дефинисани фактори растења и развића, уз одсуство флукуација абиотичких и биотичких фактора спољашње средине омогућавају даља проучавања ових генотипова у култури *in vitro*.

SUMMARY

Ocimum basilicum L. (sweet basil, basil) is among the most commonly cultivated plant species due to its nutritive and pharmacological properties. Long-term cultivation together with the commercial use of the species has led to significant variations in terms of quantitative and qualitative characteristics of different genotypes and, therefore, the quality of varieties fluctuates, not only due to genetically conditioned differences but also due to environmental factors. The most significant processes of a plant growth and development are closely related to the amount of available nutrients, particularly at the earliest stages. However, in cultivation processes, more attention is given to plant productivity and less to nutrient availability and their use by plants. Understanding of the effects of mineral nutrition through the study of responses of different genotypes to the same stress conditions can give an insight into the level of intraspecific differences in physiological responses of juvenile plants. The subjects of the conducted research are different basil genotypes (*Ocimum basilicum* L. var. *basilicum* L., *Ocimum basilicum* L. var. *minimum*, *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth. and *Ocimum* x *citriodorum* Vis. (family Lamiaceae)). The aims of study were: introduction of selected genotypes under *in vitro* conditions and establishment of the monitoring system for evaluation of physiological and biochemical changes during the plant growth and development through the seedling culture forming; evaluation of the effects of nutrient availability and nitrogen forms on germination characteristics and primary metabolism; determination of intraspecific variations in oxidative-stress responses due to nutrient deprivation; examination of pathways for the synthesis of secondary metabolites and the degree of connectivity between primary and secondary basil metabolisms in conditions of nutrient deprivation; determination of intraspecific variability in the amount of total phenolic compounds, flavonoid concentration and total antioxidant activity due to nutrient-induced stress; determination of qualitative differences in the production of the most common bioactive compounds in the plant material through the quantification of selected secondary metabolites; clear definition of nutritive requirements of individual genotypes. The first part of the research involved the introduction of selected basil genotypes under *in vitro* conditions and the development of the seedling culture as a system for monitoring of physiological responses of basil. The second part of the experiments was conducted to test the influence of the quantitative and qualitative composition of mineral nutrition on the physiological response of various basil genotypes under *in vitro* conditions. The treatments included different concentrations of mineral elements (low, medium and high concentrations) with KNO₃ as the main source of nitrogen, as well as different concentrations of mineral elements, but with KNO₃ and NH₄NO₃ as a nitrogen source.

As a result of the research the protocols were successfully developed, and the *in vitro* culture of seedlings was reliably developed for four basil genotypes: *Ocimum basilicum* var. *basilicum*, *Ocimum basilicum* var. *minimum*, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* and *Ocimum* x *citriodorum*. It was found that the presence of an ammonium form of nitrogen reduces the ability of the seeds to germinate with all examined genotypes, the nutritional requirements in terms of seed germination being genotype-specific. Firstly, the results, obtained by examining the extent of primary metabolic processes through the determination of the concentration of structural components, indicate the need for genotype-individualized mineral nutrition to achieve maximum results in productivity and exploitation of this economically important plant species. Secondly, the results, obtained by analyzing the enzymatic components' activities of the examined genotypes' immune antioxidative system, indicate the existence of intraspecific differences in correlation of enzyme activities under stress conditions, the nutrition based on ammonium ions being an additional stress factor. In addition, the differences are noticeable in relation to the examined plant parts of the same genotype. Underground parts of the examined genotypes, in conditions of moderate nutritive stress, demonstrated high concentrations of phenolic compounds, as well as high antioxidant activity compared to above-ground parts. The testing of phenylalanine ammonium lyase activity, a key enzyme between primary and secondary metabolism, represents a significant contribution to the illumination of pathways for the synthesis of secondary metabolites. Under *in vitro* conditions, defined in this study for each of the genotypes examined, a high concentration of rosmarinic acid and caffeic acid (phenolic acids with increasingly significant uses) was quantified in a short time. It has been shown that the seedling culture is a suitable system which, in controlled conditions, allows a study of complex characteristics of the juvenile period, as well as a study of the early physiological responses of plant organisms to the effects of individual factors. Additionally, the *in vitro* culture of basil seedlings allows the production of significant metabolites in high concentrations. Mechanisms of overcoming prolonged nutritive stress during the juvenile stage of the seedlings of *Ocimum basilicum* var. *basilicum*, *Ocimum basilicum* var. *minimum*, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* and *Ocimum* x *citriodorum* are genotype-specific. Controlled conditions and defined growth and development factors, with the absence of fluctuations in the abiotic and biotic factors of the environment, will enable further studies of these genotypes in different *in vitro* cultures.

УВОД

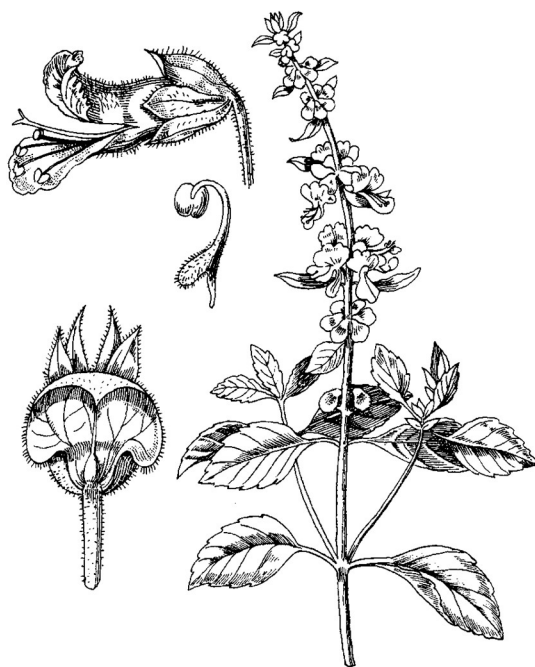
1. Таксономске и морфолошке карактеристике рода *Ocimum* L.

Род *Ocimum* L. (босиљак) један је од најексплоатисанијих родова фамилије уснатица (Lamiaceae). Основне карактеристике свих представника ове фамилије јесу четвороугаоно стабло, наспрамно постављени листови са доста жлезданих длака и изразито зигоморфни цветови са две различите усне. Род *Ocimum* L. припада подфамилији Nepetoideae коју одликује присуство изразито ароматичних есенцијалних уља. Заједно са другим економски значајним представницима фамилије уснатица, као што су врсте родова *Rosmarinus*, *Thymus* и *Salvia*, род *Ocimum* припада племену *Ocimeae* чија је основна морфолошка карактеристика присуство прашника положених преко доње усне крунице (Paton и сар., 1999).

Таксономски, род је први пут описан 1753. године од стране Линеа (Carl von Linné) који је у оквиру рода *Ocimum* убројао пет врста, али се од тада класификација овог рода вишеструко мењала. Џорџ Бентам (George Bentham) 1832. године роду *Ocimum* додаје око 40 врста и групише их у три секције: *Ocimum* (*Ocymodon* Benth.), *Hierocymum* Benth. и *Gymnocymum* Benth., при чему су чланови секције *Ocimum* на основу морфологије чашице 1848. године груписани у три подсекције: *Ocimum*, *Gratissima* и *Hiantia*. Pushpangadan (1974) је аутор инфрагенеричке класификације према којој се разликују две групе: *Basilicum* група (зељасте једногодишње, ретко вишегодишње биљке са црним, елипсоидним, јако муцинозним семенима и основним бројем хромозома $x = 12$) и *Sanctum* група (укључује вишегодишње жбунасте форме са лоптастим, браон семенима, без или са јако мало слуги и основним бројем хромозома $x = 8$). Према овом аутору, *Basilicum* група садржи једино секцију *Ocimum* са подсекцијом *Ocimum* заједно са најраспрострањенијим таксонима (var. *basilicum*, var. *difforme*, var. *purpurascens* и други), док су сви остали представници сврстани у *Sanctum* групу. Данас се овакав вид класификације најчешће користи у научно-популарној литератури. Међутим, основни проблем са оваквим видом инфрагенеричке класификације је неусклађеност са стандардима Интернационалног Кода Ботаничке Номенклатуре (Paton и сар., 1999; Carović-Stanko и сар., 2011).

Данас је у оквиру рода *Ocimum* сврстано око 150 једногодишњих и вишегодишњих врста зељастих биљака, ређе жбуња, аутохтоних у тропским и суптропским деловима Азије, Африке и централним деловима Јужне Америке (Labra и сар., 2004). Најбројније су једногодишње зељасте

биљке код којих одсуствује ризом и присутан је површински коренов систем, а ређе представници имају чврсту жбунасту грађу. Карактеришу их разгранате четвороугаоне стабљике на којима су наспрамно распоређени листови на дугачким дршкама, јајоликог облика, равног или назубљеног обода и зашиљени на врху (Слика 1). Цветови се налазе на краткој цветној дршци и сложени у пршљенове организују цвасти на врху стабљике.



Слика 1. Грађа изданка, цвета и плода представника рода *Ocimum* L.

Типична сложена цваст босилџа грађена је од наспрамно постављених цимозних цвасти које организују штит на врху стабљике. Сваки пршљен је грађен најчешће из неколико цветова који су са брактејама, а код неких представника брактеје могу и изостати. Чашаца је зигоморфна, јајаста, двоусната, зелене боје, са јако истакнутим нервима и подељена је у пет режњева. Горња усна чашнице је недељена и грађена је из једног округластог режња. Доња усна чашнице је нешто дужа и издељена на четири ланцетасти режња. Облик и величина режњева могу варирати, а чашаца након периода цветања разраста. Круница је изразито зигоморфна и са круничном цеви која је затворена у чашници. Горња усна је широка, краћа и дељена је у четири режња. Доња усна је дужа и испупчена. Прашници леже на доњој усни. Плодови су јајасте и мрке орашице (Filip, 2014). У плодовима се развијају семена која су углавном изразито муцинозна.

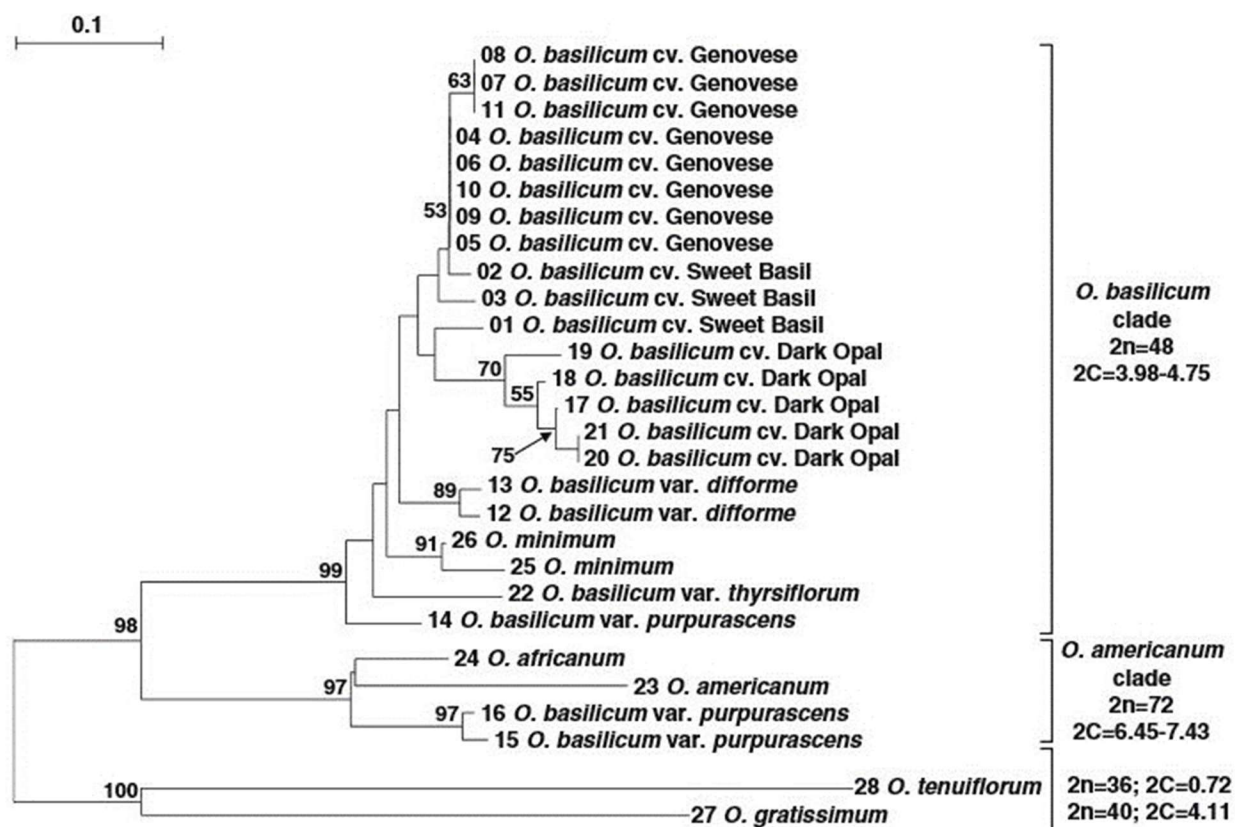
Култивација терапеутски важних представника рода *Ocimum* глобално је интензивирана, пре свега због њиховог фармацеутског и нутритивног значаја, као и широког опсега прилагодљивости различитим типовима земљишта и климатским условима. Дугогодишња традиционална употреба представника овог таксона, заједно са широком дистрибуцијом, селекцијом и укрштањем, знатно је допринела варијабилности међу коришћеним сортама које су јако бројне, при чему их узгајивачи углавном могу разликовати на основу величине и боје листова (зелена до тамно љубичаста), боје цвета (бела, црвена, љубичаста), као и осталих карактеристика попут облика изданка, висине, периода цветања и ароме (Carović-Stanko и сар., 2010). Међутим, критеријуми за карактеризацију таксона у оквиру рода *Ocimum* далеко су сложенији. Карактеристике које имају вишедеценијску употребу у таксономској класификацији представника рода *Ocimum* због интензивне култивације, полиплоидије и интраспецијске хибридизације показују висок степен варијабилности, укључујући карактеристике попут боје, облика и величине цвета, листа и стабљике, репродуктивно понашање и хемијски састав (Patel и сар., 2016).

Најновије таксономске студије се, у циљу постизања боље интра- и интерспецијске класификације, заснивају на различитим приступима, укључујући географско порекло, морфологију, кариотип и хемијски састав. На основу географског порекла, босиљак се хемотаксономски може класификовати у 4 хемотипа: реунион (египатски) хемотип чија је главна компонента метил-кавикол (око 80%); европски хемотип са најквалитетнијом аромом и високим садржајем линалола (од 35 до 50%) и метил-кавикола (од 15 до 25%); тропски хемотип чија је главна компонента метил-цинамат; Јава (еугенолни) хемотип са високим садржајем еугенола (Hiltunen, 2003; Beatović, 2013; Filip, 2014).

Graye и сар. (1996) су приликом проучавања садржаја етарског уља различитих варијетета босиљка установили да хемотип дефинише компонента које има више од 20% од укупног садржаја етарског уља. Применом оваквог система класификације могу се разликовати линалол, метил-кавикол, еугенол, метил-еугенол и гераниол тип у оквиру таксона *Ocimum basilicum*. Према овој групи аутора таксон *Ocimum x citriodorum* припада гераниол и нерал типу.

Ипак, класификација базирана на хемотиповима има своје недостатке, узимајући у обзир да један таксон може обухватати две или више компоненти које су готово подједнако заступљене. Додатно, показано је да квантитативно-квалитативни садржај етарских уља босиљка варира у зависности од многобројних абиотичких фактора (Daneshian и сар., 2009). Значајан напредак је начињен у погледу класификације босиљка употребом ДНК анализа које омогућавају филогенетске и таксономске студије и идентификацију сорти упоређујући генотипове независно од фенотипова (Labra и сар., 2004).

Canović-Stanko и сар. (2010) су у студији која је обухватила 28 најшире употребљаваних таксона босилјка, укључујући различите врсте, варијетете и сорте, покушали да разјасне филогенетске везе у оквиру таксона, комбинујући број хромозома, величину генома и молекуларне маркер анализе. Уочен је висок ниво генетичког диверзитета, при чему су испитивани таксони сврстани у две секције – *Ocimum* и *Sanctum*. Секција *Ocimum* укључује две кладе – *Ocimum basilicum* кладу (Слика 2) сачињену од тетраплоида ($2n = 4x = 48$) са врстама *Ocimum basilicum* и *Ocimum minimum* (вероватно варијетет врсте *Ocimum basilicum*) и *Ocimum americanum* кладу (хексаплоиди са $2n = 6x = 72$) коју сачињавају врсте *Ocimum americanum* и *Ocimum africanum*. Положај *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* варира у зависности од географског порекла узорака. *Sanctum* секција укључује две врсте које карактерише мали геном и мали број хромозома - *Ocimum gratissimum* и *Ocimum tenuiflorum* (Слика 2). Класификација таксона *Ocimum* заснована на раду Canović-Stanko и сар. (2010) коришћена је у овом истраживању.



Слика 2. Таксономски положај различитих врста и варијетета босилјка у зависности од величине генома и броја хромозома (према Canović-Stanko и сар., 2010)

2. Опште карактеристике изабраних таксона

2.1. *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* L.

Ситнолисни тип босиљка (*Ocimum basilicum* L. var. *minimum* L.) је таксон са још увек недовољно разјашњеним рангом. Ранијом класификацијом је ова сорта босиљка сматрана посебном врстом *Ocimum minimum*, углавном због постојања јасних морфолошких разлика у односу на врсту *Ocimum basilicum*. Vieira и сар. (2003) су молекуларним маркер анализама утврдили сличност *Ocimum minimum* са *Ocimum basilicum* и сугерисали да *Ocimum minimum* не треба сматрати засебном врстом, већ варијететом *Ocimum basilicum*. Ово је потврђено и од стране Canović-Stanko и сар. (2010). Аутори сматрају да је у питању таксон у рангу варијетета јер садржи исти број хромозома, не постоји значајна разлика у садржају генетичког материјала у односу на *Ocimum basilicum* и таксон је само делимично репродуктивно изолован.

На основу свега наведеног, *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* L. се може уврстити у кладу *Ocimum basilicum* и секцију *Ocimum*. Морфолошки, ситнолисни босиљак је међу најнижим формама босиљка и достиже висину од 30 до 40 cm. Од 16 до 18 изданака (без трихома) формирају округласт, компактан, низак жбун ширине 40 до 50 cm (Слика 3а). На изданку се развијају карактеристично ситни, зелени листови, ланцетастог облика, слабо сјајни, делимично назубљени. Листови су ширине до 1 cm и дужине од 1.50 до 2.50 cm. На попречном пресеку лист има „V“ облик. Цветови са белом круницом и зеленом чашицом (без трихома) на врху стабљике образују цвасти (Слика 3б), а читава биљка се гаји и у декоративне сврхе (Beatović, 2013).



Слика 3. Хабитус *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* L.
а) изданак б) део цвасти

Принос свеже хербе је од 250 до 300 грама по биљци, а суве од 25 до 65 грама по биљци, при чему су етарска уља заступљена и до 1%. Процентуално су најзаступљенији монотерпени и сесквитерпени, а хемотипски класификовано, *Ocimum basilicum* var. *minimum* припада линалол хемотипу босиљка (Telci и сар., 2009). У широј употреби од овог босиљка користе се, пре свега, материје пореклом из листова и то као дигестивни стимулатори са карминативним, антипиретичким, диуретичким и антиреуматским активностима, али и као извори фенолних једињења, укључујући флавоноиде и флавоне, са високом антиоксидативном, антиулцерном и антимикробном активношћу (Grayer и сар., 2004; de Sousa и сар., 2005; Telci и сар., 2009).

2.2. *Ocimum basilicum* L. var. *basilicum* L.

Таксон *Ocimum basilicum* L. var. *basilicum* L. је најзаступљенија форма босиљка која се на основу молекуларних маркера, броја хромозома и садржаја генетичког материјала ($2n = 4x = 48$) може сврстати у кладу *Ocimum basilicum*, секција *Ocimum* (Carović-Stanko и сар. 2010). Овај варијетет укључује две сорте – „Genovese“ и „Sweet Basil“.

Ocimum basilicum L. var. *basilicum* L. cv. Genovese достиже висину до 80 cm и просечно око 15 изданак (без трихома) формирају усправан жбун ширине од 40 до 60 cm (Слика 4а). На лисним дршкама дугим до 3 cm формирају се листови дуги од 9 до 12 cm, широки од 5 до 7 cm, зелени, округли, средње сјајни, средње назубљености, на попречном пресеку испупчени. Дихазијалне цвасти (Слика 4б) дужине од 5 до 20 cm формирају се од белих зигоморфних цветова са белом круницом и чашицом без трихома (Beatović, 2013).



Слика 4. Хабитус *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese
а) изданак б) део цвасти

Једна јединка може продуковати од 200 до 300 грама свеже, и од 40 до 60 грама суве хербе у којој је етарско уље заступљено са око 0.95%. Етарско уље је најбогатије монотерпенима и сесквитерпенима, међу којима је доминантан линалол, па се ова сорта босиљка хемотаксономски класификује у оквиру линалол хемотипа босиљка (Grayer, 1996; Beatović, 2013). Резултати претходних истраживања показују значајан ниво биолошких активности материја добијених из ове сорте босиљка. Показано је материје пореклом из *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. *Genovese* поседују антимикробну и антиоксидативну активност, као и антипролиферативно, проапоптотичко, цитотоксично и антиканцерогено дејство, уз значајне концентрације фенолних једињења (Carović-Stanko и сар., 2010; Nguyen и сар., 2010; Imen и сар., 2012; Beatović и сар., 2015).

2.3. *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth.

Класификација таксона *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth. још увек се не може јасно дефинисати, јер анализирани карактеристике варирају у зависности од географског порекла узорака. Највероватније је да овај таксон припада клади *Ocimum basilicum*, секцији *Ocimum* и представља хибрид између *Ocimum basilicum* и *Ocimum forskolei* (Grayer, 1996; Carović-Stanko и сар., 2010; Filip, 2014). Најшире употребљаване сорте су „Dark Opal“ и „Purple Ruffles“.

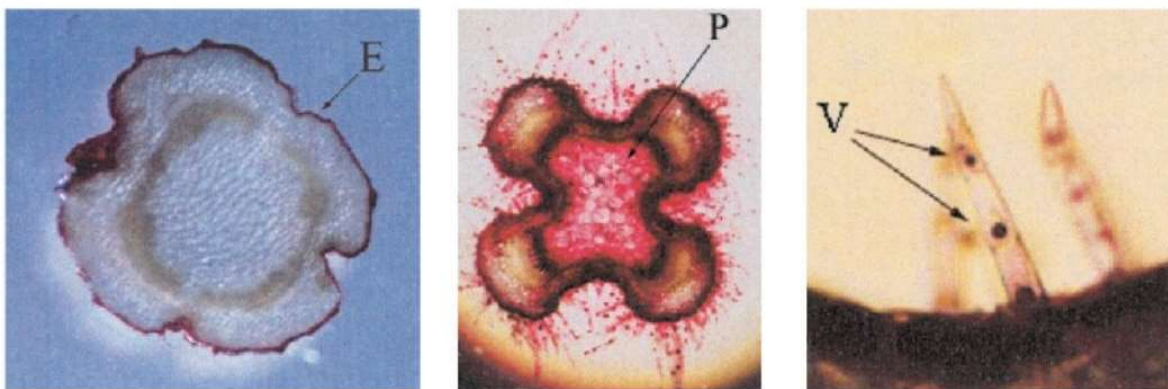
Ocimum basilicum L. var. *purpurascens* Benth. cv. *Dark Opal* (тамно љубичасти босиљак) је тетраплоидни таксон ($2n = 4x = 48$) са изданцима висине до 60 cm који формирају интермедијарни жбун тамно љубичасте боје (Слика 5a). Стабљике су са трихомима. На лисним дршкама, дугим око 3 cm, развијају се тамно љубичасти листови дуги од 5 до 8 cm и широки од 3 до 5 cm.



Слика 5. Хабитус *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. *Dark Opal*
а) изданак б) део цвасти

Листови су јајастог облика, најчешће јако сјајни, назубљени, на попречном пресеку удубљени. Зигоморфни цветови су са светлоружичастим чашичним и тамнољубичастим круничним листићима (Слика 5б).

Тамно љубичаста боја читаве биљке пореклом је од антоцијанина који су у листовима и цветовима локализовани у епидермалном слоју, док су у стаблу и цветној ложи, поред епидермалних, заступљени и у унутрашњим слојевима. У епидермису листа су, због потребе за ниском рН вредношћу, локализовани у вакуоли, а могу се наћи и у вакуолама нежлезданих трихома (Слика 6). Иако управо љубичаста боја и присуство антоцијанина повећавају употребну вредност ове сорте, нестабилност варијетета *purpurascens* у количини антоцијанина један је од главних проблема приликом култивације. Гени одговорни за синтезу антоцијанина су изузетно нестабилни, тако да и вегетативно пропагирани изданци могу изгубити љубичасту боју. Депигментација је код сорте Dark Opal праћена униформним губитком антоцијанина кроз читав изданак, док се код сорте Purple Ruffles губитак пигмената јавља у појединачним деловима изданка (Phippen и Simon, 2000).



Слика 6. Локација антоцијанина у епидермалним ћелијама стабла (Е), у ћелијама цветне ложе (Р) и вакуолама нежлезданих трихома (V) (према Phippen и Simon, 2000)

Принос свеже хербе овог генотипа босиљка је од 110 до 200 грама по биљци, а суве од 15 до 30 грама по биљци, при чему је у херби заступљено до 0.95% етарског уља. Међу хемијским једињењима у херби су најзаступљенији монотерпени и сесквитерпени, а сорта Dark Opal хемотаксономски припада линалол хемотипу босиљка (Beatović, 2013). Читава биљка је, поред антоцијанина, богата и многобројним фенолним једињењима која показују значајан ниво биолошких активности, укључујући и антиоксидативну, цитотоксичну, антипролиферативну, антиканцерогену и проапоптотску активност (Nguyen и Niemeуer, 2008; Flanigan и Niemeуer, 2014; Elansary и Mahmoud, 2015).

2.4. *Ocimum x citriodorum* Vis.

Лимун босиљак, *Ocimum x citriodorum* Vis. (синоними *Ocimum x americanum*, *Ocimum africanum*) се сматра природним хибридом између *Ocimum basilicum* и *Ocimum americanum* (Paton и Putievsky, 1996; Vieira и сар., 2003). Ова карактеристична форма босиљка са јаком аромом налик лимуну карактерише се већим геномом и већим нивоом плоидије ($2n = 6x = 72$), па се сврстава у кладу *Ocimum americanum*, секцију *Ocimum* (Carović-Stanko и сар., 2010).

Ocimum x citriodorum достиже висину од 30 до 50 cm, а 8 до 10 изданака формирају жбун ширине од 35 до 50 cm (Слика 7а). На лисној дршци дужине до 3 cm формирају се зелени, ланцетасти, средње сјајни листови, ширине од 2.50 до 3.50 cm и дужине од 4 до 6 cm. Листови су средње назубљености и на попречном пресеку са „V“ обликом. Беличасти цветови формирају цвасти које достижу дужину и до 25 cm (Слика 7б). Изузев цветова, остали зељаста делови изданака су прекривени трихомима. Принос свеже хербе је од 80 до 160 грама по биљци, а суве од 15 до 25 грама по биљци, при чему су етарска уља заступљена са око 0.90%.

Процентуално је најзаступљенији монотерпен цитрал, а хемотипски класификовано таксон *Ocimum x citriodorum* припада цитралном (герениал/нерал) хемотипу босиљка (Beatović, 2013; Grayer, 1996).

Поред есенцијалних уља, овај генотип босиљка садржи и фенолна једињења која показују и значајан ниво антибактеријске, антиоксидативне, антифунгалне, биохербицидне, као и инсектицидалне активности (Dudai и сар., 1999; Grayer и сар., 2004; Carović-Stanko и сар., 2010; Tang и сар., 2013; Zabka и сар., 2014).



Слика 7. Хабитус *Ocimum x citriodorum* Vis.
а) изданак б) део цвасти

3. Активација и регулација примарног метаболизма током клијања семена

У семену су, у виду резерви, ускладиштена хетерогена једињења која укључују различите угљене хидрате, полимере скроба, протеине и липиде, а као последица карактеристика саме биљке и стања животне средине. Развој семена је динамичан процес којим координирају три различите структурне компоненте семена – ембрион, хранљиво ткиво и семењача (Sreenivasulu, 2017; Gupta и сар., 2017).

Најчешће дефинисање процеса клијања семена *sensu stricto* односи се на све процесе који воде ка пробијању семењаче и појави радикале, тј. коренка, при чему целокупни процес клијања укључује две фазе – рану фазу која обухвата најранији одговор семена на присуство воде и имбибицију семена, и другу, касну фазу, која обухвата све процесе након имбибиције до појаве радикале. Развој семена се завршава процесом десикације и у потенцијално клијајућим семенима mRNK, протеини, различити градивни елементи, као и различити транскрипти, складиште се за период од неколико месеци до више година, у зависности од биљне врсте и услова спољашње средине. Иако се овај период сматра периодом у коме су метаболизам и сви ћелијски процеси у мирујућој фази, одређени ензими су активни чак и у десикованим семенима. Заступљеност ускладиштених метаболичких ензима, mRNK и одређених метаболита у десикованим семенима сведочи о фундаменталној улози активације метаболичких процеса у најранијим фазама клијања семена (Angelovici и сар., 2009; Rosental и сар., 2014).

Иницијална, прва фаза у клијању семена, тзв. прегерминација, почиње брзим и пасивним усвајањем воде из спољашње средине (имбибицијом), што доводи до низа динамичких, биохемијских догађаја, укључујући активацију ензима и разградњу, употребу и транслокацију органских материја. Имбибиција која наступа током прве фазе клијања семена је искључиво физички процес који, поред брзог усвајања воде, карактерише и отпуштање гасова и промена температуре. Пасивно, убрзано усвајање воде праћено је *lag* фазом у апсорпцији воде и повећаном синтезом АТР-а, након чега се апсорпција воде поново убрзава. Повећану апсорпцију воде прати интензивно усвајање кисеоника и ослобађање угљен-диоксида, тј. интензивирање процеса дисања који укључује гликолизу и β -оксидацију масних киселина (Van Dongen и сар., 2011; Weitbrecht и сар., 2011; Macovei и сар., 2017).

Пируват као продукт гликолизе, заједно са другим изворима ацетил коензима А (CoA), мора бити укључен у циклус трикарбонских киселина (TCA циклус) у митохондријама, како би се у потпуности искористио енергетски потенцијал. Иако су у овој фази митохондрије само делимично развијене, ове органеле имају могућност оксидације различитих супстрата (укључујући сукцинат и

NADPH) и продукције АТР-а. Одмах након започете имбибиције, па све до пробијања радикуле, површина митохондријалних кристи расте, па је омогућена интензивираниа респирација у првим сатима имбибиције, као и продукција АТР-а посредством ТСА циклуса. Овај период праћен је још и деградацијом ускладиштених протеина и њиховом *de novo* синтезом, деградацијом резерви угљених хидрата, превођењем триацилглицерола у глицерол и масне киселине, интензивираним глиоксилатним циклусом и повишеном активношћу ензима укључених у ове процесе. Осим тога, неопходно је и постизање адекватног редокс-статуса у ћелијама како би се уједначила активност ТСА циклуса и митохондријалног електрон-транспортног ланца. Ране фазе у клијању круцијалне су за вијабилност семена јер обухватају кључне догађаје којима семе прелази из стања мировања у стање раста ембриона. Даљим током процеса дисања током имбибиције, реактивација митохондријалног електрон-транспортног ланца доводи до повећане продукције ROS, тако да је дуална функција ROS (и као сигналних и као штетних молекула) присутна током читавог живота биљке. Трајање имбибиције и почетак друге фазе зависе од биљне врсте и фактора спољашње средине у којој се семе налазило до контакта са водом (Van Dongen и сар., 2011; Rosental и сар., 2014; Kumar и сар., 2015; Masovei и сар., 2017).

У другој фази се настављају метаболички процеси започети у првој фази, при чему се могу уочити значајне физиолошке разлике. Разлике се односе првенствено на ниво кисеоника и количину глукозе и фруктозе у ћелијама, али и у заступљености гликолитичких ензима чија је активност индукована у овој фази клијања. Како би убрзале разградњу протеина, протеазе се поново синтетишу, при чему деградација протеина обезбеђује аминокиселине за *de novo* синтезу протеина. Глиоксилатни циклус и β -оксидација масних киселина одвијају се углавном у специјализованим семеним пероксизомима – глиоксизомима. У десикованим, неимбибованим семенима ове органеле заступљене су у неразвијеном облику, да би у каснијим фазама клијања акумулирале есенцијалне ензиме глиоксилатног циклуса, малат синтазу и изоцитрат лиазу. Јединствени циљ свих ових метаболичких процеса јесте продукција енергије и градивних елемената неопходних за морфолошке промене које прате клијање. Да би семе клијало радикула се мора издужити и пробити семењачу, при чему се значајна регулација овог ступња клијања одвија на нивоу ендосперма који окружује радикулу и на нивоу хидролитичких ензима ћелијског зида. Механички отпор ћелија ендосперма додатно је смањен посредством хидроксил-радикала ($\text{OH}\cdot$) који смањује чврстину ћелијског зида (Müller и сар., 2009; Iglesias-Fernandez и сар., 2011).

Временски оквир трајања процеса клијања (од момента пасивног усвајања воде до разградње семењаче и појаве радикуле) генетички је условљен, али у многоме зависи и од фактора спољашње средине. Клијање семена и последично издуживање радикуле и хипокотила су међу најзначајнијим

фазама животног циклуса биљке, али су уједно и фазе у којима је биљка најосетљивија на факторе спољашње средине. Иако су десикована семена углавном отпорна на стресне услове спољашње средине, клијајућа семена, као и клијанци биљака нису, па сходно томе и захтевају одбрамбене стратегије за суочавање са абиотичким и биотичким стресом како би се осигурало преживљавање. Одговор на овакве услове зависи од типа и интензитета стреса, али и биљне врсте и генотипа (Macovei и сар., 2017). Комплетна герминација захтева протекцију од реактивних врста кисеоника које се продукују током овог процеса (Esrahanу и сар., 2016).

4. Асимилација неорганских компоненти и контрола примарног метаболизма

Продуктивност биљака зависи од апсорбовања и конверзије соларне енергије у процесу фотосинтезе и последичног уграђивања редукваног угљеника у процесе неопходне за растење и репродукцију (Attaran и сар., 2014). Фундаментални процеси током којих биљке асимилију угљеник и азот у компоненте неопходне за растење и развиће условљени су селективном партицијом органских метаболита између органела, ћелија, ткива и органа. Диверзитет продукованих метаболита, као и путева током којих се метаболити уграђују у различите комплексе је широк, при чему су и сами путеви синтезе и уграђивања партиционисани између органела, ћелија, ткива и органа (Tegeder и Weber, 2006).

4.1. Асимилација угљеника

Хлоропласти су једина места фотосинтетичке асимилације угљеника и доминантна места асимилације азота. Неоргански CO_2 се преводи у органски угљеник у строми хлоропласта у редуктивном пентозо-фосфатном (Калвиновом) циклусу. Акцептор CO_2 је рибулоза 1,5-бисфосфат (RubP) која уз помоћ Rubisco ензима (риболаза 1,5-бисфосфат карбоксилаза/оксигеназа) гради интермедијарно C_6 једињење које се убрзо хидролизује на два молекула 3-фосфоглицеринске киселине (3-PGA). 3-PGA је први стабилни интермедијарни продукт фиксације угљеника и бива редукван у глицералдехид 3-фосфат (GAP). Карбоксилација једног молекула RubP и редукција два молекула 3-PGA захтевају утрошак два молекула АТФ и два молекула NADPH, при чему се GAP врло лако може конвертовати у дихидроксиацетон 3-фосфат (DAP). Пет од шест насталих триозо-фосфата улазе у процесе регенерације акцептора редуктивног пентозо-фосфатног циклуса, док триозо-фосфати који нису неопходни за процес регенерације или бивају задржани у строми хлоропласта или транслоцирани у цитосол посредством триозо-фосфатних транслокатора (TRP).

ТРТ су котранспортери који износе из хлоропласта триозе у размену за један неоргански фосфат (Pi), али приликом транспорта не прихватају фосфоенолпируват (PEP), пентозо-фосфате или хексозо-фосфате, што је значајно због одржавања хомеостазе пластидијалних фосфата у строми хлоропласта, пошто су они неопходни за синтезу АТФ-а током светле фазе фотосинтезе (Neuhaus и Wagner, 2000; Tegeder и Weber, 2006; Linka и Weber, 2010).

Триозо-фосфати настали асимилацијом угљеника у редуктивном пентозно-фосфатном циклусу представљају главне прекурсоре за све друге биосинтетичке реакције код биљака. Биосинтеза скроба и биосинтеза сахарозе су метаболички процеси у којима се триозо-фосфати искоришћавају, при чему је неопходна регулација поделе угљеника између ових конкурентних путева у зависности од метаболичких потреба биљке. Биосинтеза скроба и сахарозе као главних резервних шећера повезана је са нередукиционом природом ових молекула, што представља предност приликом транспорта и даљег складиштења ових молекула (Lemoine, 2000; Tegeder и Weber, 2006).

Иако се највећа количина асимилованог угљеника искористи за биосинтезу скроба и сахарозе, постоји значајна потреба за овим елементом као прекурсором за велики број примарних и секундарних метаболичких путева. Редуковани угљеник може бити директно уклоњен из регенеративне фазе Калвиновог циклуса (нпр. у форми еритрозе 4-фосфата (E4-P) који се укључује у пут шикимске киселине) или бива транслоциран у цитосол као триозо-фосфат који ће бити конвертован у прекурсоре за митохондријално дисање или укључен у синтезу органских киселина, аминокиселина итд. Све ове биосинтетичке реакције и метаболички процеси синтезе различитих продуката регулисани су на нивоу транскрипције, транслације, пост-транслационе и алостеричке контроле активности ензима, субћелијске компартментације и дистрибуције специфичних путева између различитих ткива. Додатно, фактори спољашње средине (температура, светлост, нутритивни статус, доступност воде итд.) значајно утичу на регулацију свих ових процеса током растења и развића биљака (Tegeder и Weber, 2006).

Неадекватна количина нутријената врло брзо доводи до физиолошког одговора који се, пре свега, заснива на одвајању већег процента биомасе на коренов систем. Овај адаптивни одговор последица је метаболичких промена у стаблу и транспорта угљених хидрата до корена, тако да дисбаланс у нутритивном статусу последично доводи до високе концентрације угљених хидрата у корену, до повећаног односа у маси стабла и корена и поремећаја у фотосинтетичким процесима (Hermans и сар., 2006).

4.2. Асимилација азота

Као конституент аминокиселина и нуклеинских киселина, азот је есенцијална компонента биљних ћелија на структурном, генетичком и метаболичком нивоу и укључен је у многе процесе растења и развића. У земљишту се неорганске форме азота продукују од стране микроорганизама и представљају мање од 5% укупног азота. Неоргански азот је у земљишту доступан у два облика, као NO_3^- (нитратни) јон и као NH_4^+ (амонијумов) јон. И поред тога што се, за разлику од амонијумових јона који се апсорбују за колоидне честице земљишта, нитратни јони веома лако спирају у дубље слојеве земљишта и што је за њихову редукцију потребно знатно више енергије него за директну апсорпцију амонијака, за већину биљака нитратни јони су главни извори азота. Како концентрација нитратних јона у земљишту варира у широком опсегу (од 10 μM до 100 μM), нелегуминозне биљке се морају адаптирати на просторну и временску флукуацију доступности овог есенцијалног елемента (Miller, 2007; Christophe и сар., 2011).

Током вегетативне фазе, меристемском ткиву и органима који се развијају потребне су велике количине азота за синтезу и складиштење аминокиселина које се инкорпорирају у протеине. Процесом осмозе, нитратни и амонијумови јони, заједно са водом и минералним материјама, дифундују из земљишта у ћелије корена. У корену се апопластом и симпластом транспортују до ендодермалних ћелија које окружују ксилем и флоем, одакле се, због присуства Каспаријевих трака, јони активним транспортом транслоцирају до ксилемских трахеида (Enstone и сар., 2002).

Молекуларна основа прилагођености биљака на варирање доступне количине азота заснива се на присуству нитратних и амонијумових транспортера чији афинитети варирају. Када је земљишна концентрација азота испод 1 mM, преобладајући је транспортни систем високог афинитета (*high affinity transport system* – HATS), док је за концентрације азота изнад 1 mM преобладајући транспортни систем ниског афинитета (*low affinity transport system* – LATS). Главна компонента HATS су плазмемембрански протеини епидермиса, кортекса и ендодермиса корена чија је синтеза регулисана од стране NRT2 генске фамилије. Део LATS су протеини (чија је синтеза под контролом NRT1 генске фамилије, која је такође укључена у регулацију развоја корена и транспорту ауксина) који су лоцирани у епидермису, кортексу и ендодерму вршних делова корена. И HATS и LATS преносе нитрате у контранспорту са протонима (Little и сар., 2005; Hermans и сар., 2006; Remans и сар., 2006; Christophe и сар., 2011; Bai и сар., 2013).

Када једном уђе у ћелију (у котранспорту са протонима), нитратни јон је подложен редукцији. Редукција нитрата се увек обавља у два ступња – најпре до нитрита, а након тога до

амонијумових јона помоћу нитратне и нитритне редуктазе. Редукција нитрата је, у зависности од биљне врсте, доступне количине нитрата и потребне енергије, ткивно специфична. Асимиловани нитрати могу се редуктовати у корену или се усвајање врши у подземним органима, а даља редукција и синтеза органских једињења се обавља у листовима (Schjoerring и сар., 2002). Нитратна редуктаза користи NADH као донор електрона у процесу редукције нитрата, при чему се процес одвија у цитоплазми. Настали нитрити се даље редукују помоћу нитритне редуктазе која је локализована искључиво у пластидима (у хлоропластима ћелија листа и у ћелијама корена). У листовима, електрони за редукцију су пореклом од редукованог фередоксина из фотосинтетичког електрон-транспортног ланца (PET) (редукција нитрита је алтернативни пут за електроне PET-а), док се ћелије корена и ћелије листа у условима мрака електронима снабдевају од NADH пореклом из респираторног метаболизма (Stitt, 1999).

Због своје високе токсичности чак и при ниским концентрацијама, као и евентуалног ремећења процеса респирације, амонијумови јони се морају неодложно и у што краћем року асимилувати у нетоксичне органске компоненте. Асимилација амонијума одвија се у ћелијама корена. NH_4^+ јони, настали или редукцијом нитрита или директно асимилацијом амонијума, неодложно се асимилију од стране GS-GOGAT система (систем глутаминска синтетаза и глутамин-оксоглутарат-аминотрансфераза) и формирају глутаминску киселину (глутамат) и глутамин. Активност ензима GS-GOGAT система регулисана је генима задуженим за синтезу пластидних и цитоплазматских глутамин-синтетаза и GOGAT. Асимилација је праћена и синтезом органских киселина, пре свега α -кетоглутарне киселине (која служи као акцептор амонијума у GOGAT систему) и малата који спречава алкализацију. Поред тога, значајно је повећана транскрипција гена NIA и NII који кодирају протеине укључене у синтезу ових аминокиселина, као и активност одговарајућих ензима (Raab и Terry, 1995; Stitt, 1999; Schjoerring и сар., 2002).

Глутаминска киселина (која у извесној количини увек постоји у биљним ћелијама) прима NH_4^+ јон и прелази у глутамин уз помоћ ATP и ензима GS. GOGAT након тога катализује прелазак амино-групе са глутамина на α -кетоглутарну киселину, при чему настају два молекула глутаминске киселине. Настала глутаминска киселина се делом враћа, а делом служи за изградњу једињења која садрже азот. Ове две реакције, које се још означавају и као GS/GOGAT циклус, су данас опште прихваћене као примарни пут асимилације азота код биљака. Код виших биљака GOGAT је заступљен у две различите изоформе – NADH зависна GOGAT (NADH-GOGAT) и фередоксин зависна GOGAT (Fd-GOGAT). NADH-GOGAT је, пре свега, активна у нефотосинтетичком ткиву и младим органима који расту. Експресија гена задужених за синтезу Fd-GOGAT (GLU1 и GLU2)

ткивно је специфична. GLU1 гени су доминантни у листовима, док се GLU2 гени експримирају у корену (Lam и сар., 1996; Oliveira и сар., 1997; Temple и сар., 1998; Stitt, 1999).

Међусобне условљености нитратног и угљеничног метаболизма до сада су вишеструко потврђене. Неоргански азот је неопходан за искоришћавање угљених хидрата за процесе растења и фотосинтезе, док угљеник обезбеђује, поред енергије, и скелет који пружа потпору асимилацији неорганског азота и синтези протеина (Fritz и сар., 2006). Додатно, интеракција између ова два метаболизма од пресудног је значаја за побољшање толеранције на стресне услове (Reguera и сар., 2013; Jian и сар., 2017). И оксидативни пентозо-фосфатни пут и Калвинов циклус обезбеђују угљеничне скелете у форми еритрозе 4-фосфата који, заједно са фосфоенолпируватом пореклом из гликолизе, постаје прекурсор за фенилпропаноидни метаболизам посредством пута шикимске киселине (Caretto и сар., 2015).

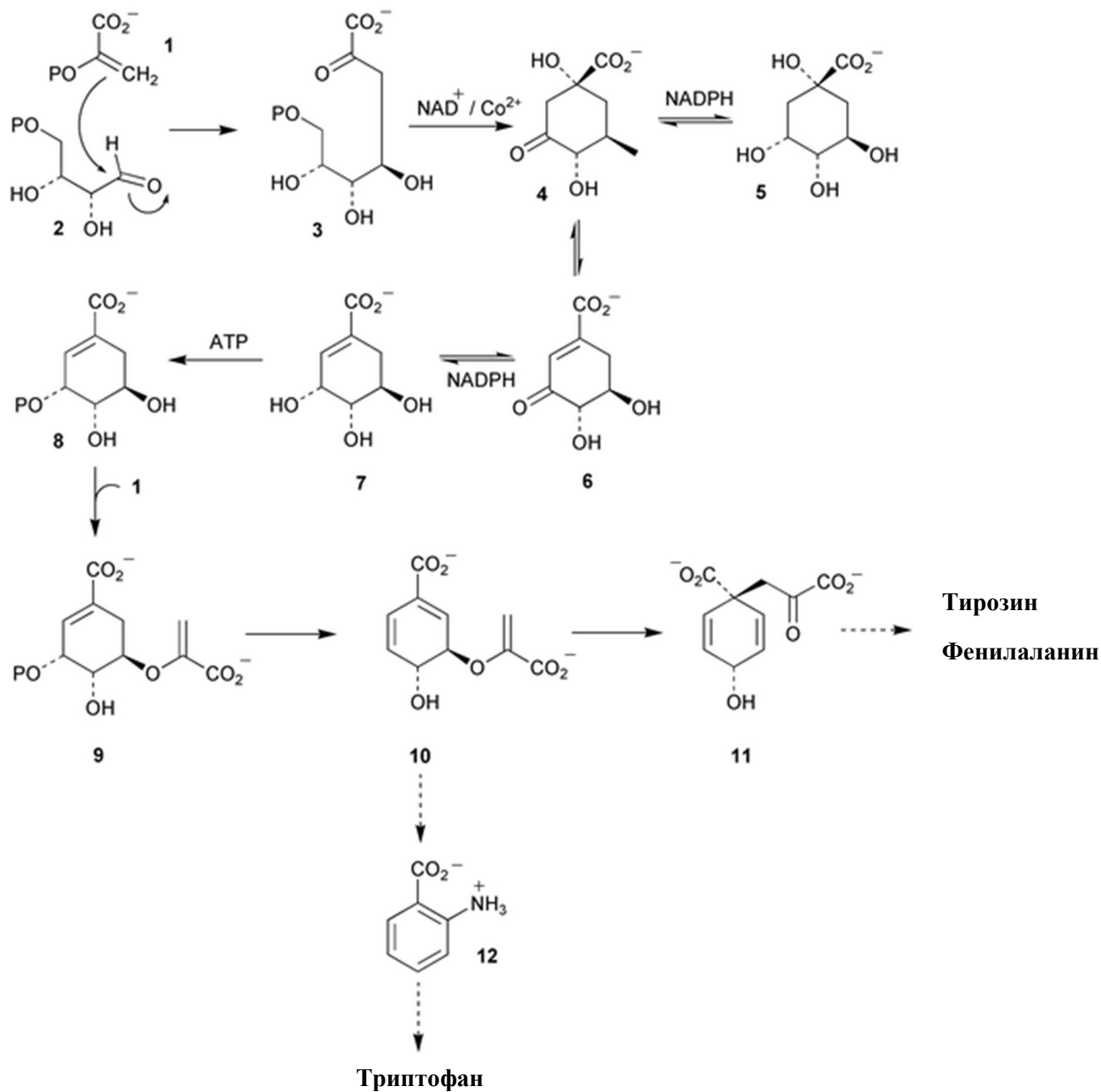
5. Синтеза протеина и пут шикимске киселине

Код биљака хлоропласти су доминантна места унутарћелијске синтезе аминокиселина. Аминокиселине Val, Arg, His, Leu, Trp, Met, Phe, Cys, Lys и Glu се искључиво синтетишу у строми ових пластида, док се остале аминокиселине могу синтетисати у митохондријама или у цитосолу. Искључива или доминантна локализација биосинтетичких путева синтезе аминокиселина у строми пластида захтева систем који уноси прекурсоре и кофакторе који учествују у путевима синтезе аминокиселина, али и систем за извоз аминокиселина (које су неопходне другим ћелијским компартментима како би се синтетисали протеини) или аминокрупа (како донора за друге биосинтетичке путеве). Ароматичне аминокиселине фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr) и триптофан (Trp) представљају централне молекуле биљног метаболизма јер, и поред тога што су есенцијалне компоненте у изградњи протеина, значајни су прекурсори биљних хормона и широког спектра ароматичних секундарних метаболита са бројним биолошким функцијама. Синтеза Phe, Tyr и Trp одвија се преко тзв. пута шикимске киселине. Пут шикимске киселине је локацијски ограничен искључиво на строми пластида. Комплексна, интрацелуларна, пластидијална локација шикимског пута је последњих година интензивно проучавана и утврђено је да гени укључени у пут шикимске киселине највероватније воде порекло не од заједничког цијанобактеријског прокариотског претка, већ од најмање три различита извора, при чему је филогенија праћена комплексним губицима и додавањем функција у више корака (Tegeder и Weber, 2006; Vogt, 2010).

Пут шикимске киселине (Слика 8) започиње кондензацијом фосфоенолпирувата (PEP) (Слика 8₁) и еритрозе 4-фосфата (E4-P) (Слика 8₂), при чему настаје 3-дезокси-D-хеопулозо-7-

фосфат (ДАНР) (Слика 8₃) и неоргански фосфат уз помоћ ензима ДАНР синтазе (ДАНРС). Иако је РЕР пореклом из гликолизе, хлоропластима (за разлику од других пластида) недостају енолазе и фосфоглицеромутазе, тако да триозо-фосфати не могу бити конвертовани у РЕР у строми пластида, већ захтевају транспортни систем за улазак РЕР у пластидијалну строму. Е4-Р углавном бива повучен из пентозо-фосфатног циклуса и продукује се, заједно са ксилулозо 5-фосфатом (Хул5-Р) од фруктозо 6-фосфата (F6-Р) и GAP у реверзибилној реакцији коју катализује транскетолаза (ТК). Транскетолаза је значајна гранична тачка обзиром да је F6-Р прекурсор за синтезу скроба, GAP може бити транслочиран у цитосол, а Е4-Р може бити или прекурсор за пут шикимске киселине или може служити за продукцију Хул5-Р. Иако је ДАНРС значајна гранична тачка у прелазу примарног метаболизма у шикимски пут, још увек није потврђено да ли овај ензим служи као главни регулатор флуksа између примарног и секундарног метаболизма, или је његова активност превасходно везана за компетицијско преузимање РЕР из гликолизе и Е4-Р из пентозо-фосфатног циклуса. Након синтезе ДАНР, накнадно затварање прстена, дехидратација и редукција (Слика 8_{4, 5, 6}) доводе до продукције шикимата (Слика 8₇). Шикимат се посредством шикимат киназе конвертује у шикимат 3-фосфат (Слика 8₈) који се преводи у 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат (EPSP) (Слика 8₉) посредством EPSP синтазе. Крајњи корак шикимског пута је праћен елиминацијом фосфатне групе из EPSP посредством хоризмат синтазе при чему настаје хоризмат (Слика 8₁₀), одакле се путеви синтезе ароматичних аминокиселина раздвајају (Слика 8_{11, 12}) (Wildermuth и сар., 2001; Tegeder и Veber, 2006; Garcion и сар., 2008; Tzin и Galili, 2010; Fraser и Chapple, 2011; Galili и сар., 2016).

Први корак у синтези аминокиселине фенилаланин (Phe) катализован је ензимом хоризмат мутаза који конвертује хоризмат у префенат. Трансаминацијом настаје арогенат, а уклањањем хидроксилне и карбоксилне групе посредством арогенат дехидрогеназе настаје фенилаланин. Неоксидативна деаминација фенилаланина до *trans*-цинамата и проток угљеника од шикимског пута до различитих грана фенилпропаноидног метаболизма катализовани су од стране фенилаланин амонијум лиазе – PAL ензим (Tzin и Galili, 2010; Fraser и Chapple, 2011). Аналогно овој хемијској реакцији, конвертовање, тј. деаминација тирозина, катализована је од стране тирозин амонијум лиазе (TAL), при чему деаминацијом настаје *p*-кумаринска киселина, а ензим је значајан у синтези лигнина при изградњи ћелијског зида (Ganapathy и сар., 2016; Maeda, 2016).



Слика 8. Пут шикимске киселине (према Knaggs, 2003)

1) фосфоенолпируват 2) еритроза 4-фосфат 3) 3-дезоксид-Д-хептулозо-7-фосфат (DAHP) 4-6) процеси редукције и дехидратације 7) шикимат 8) шикимат 3-фосфат 9) 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат (EPSP) 10) хоризмат 11, 12) раздвајање путева синтезе ароматичних аминокиселина

5.1. Фенилпропаноидни метаболизам

Фенилпропаноидни метаболизам је за биљке неопходан метаболички пут којим се синтетишу градивне компоненте неопходне за васкуларни интегритет и структурну подршку, али и стартно место продукције многих значајних метаболита укључених у одбрану од биотичких и биотичких фактора спољашње средине.

Ензим фенилаланин амонијум лиаза (PAL) катализује први корак у фенилпропаноидном метаболизму у коме фенилаланин подлеже деаминацији, при чему настаје *trans*-циметна киселина и амонијум. Експресија гена одговорних за активност PAL ензима контролисана је развојно и просторно, а разлике у активности се додатно могу јавити и услед биотичких и абиотичких стресних фактора (Vogt, 2010; Fraser и Chapple, 2011).

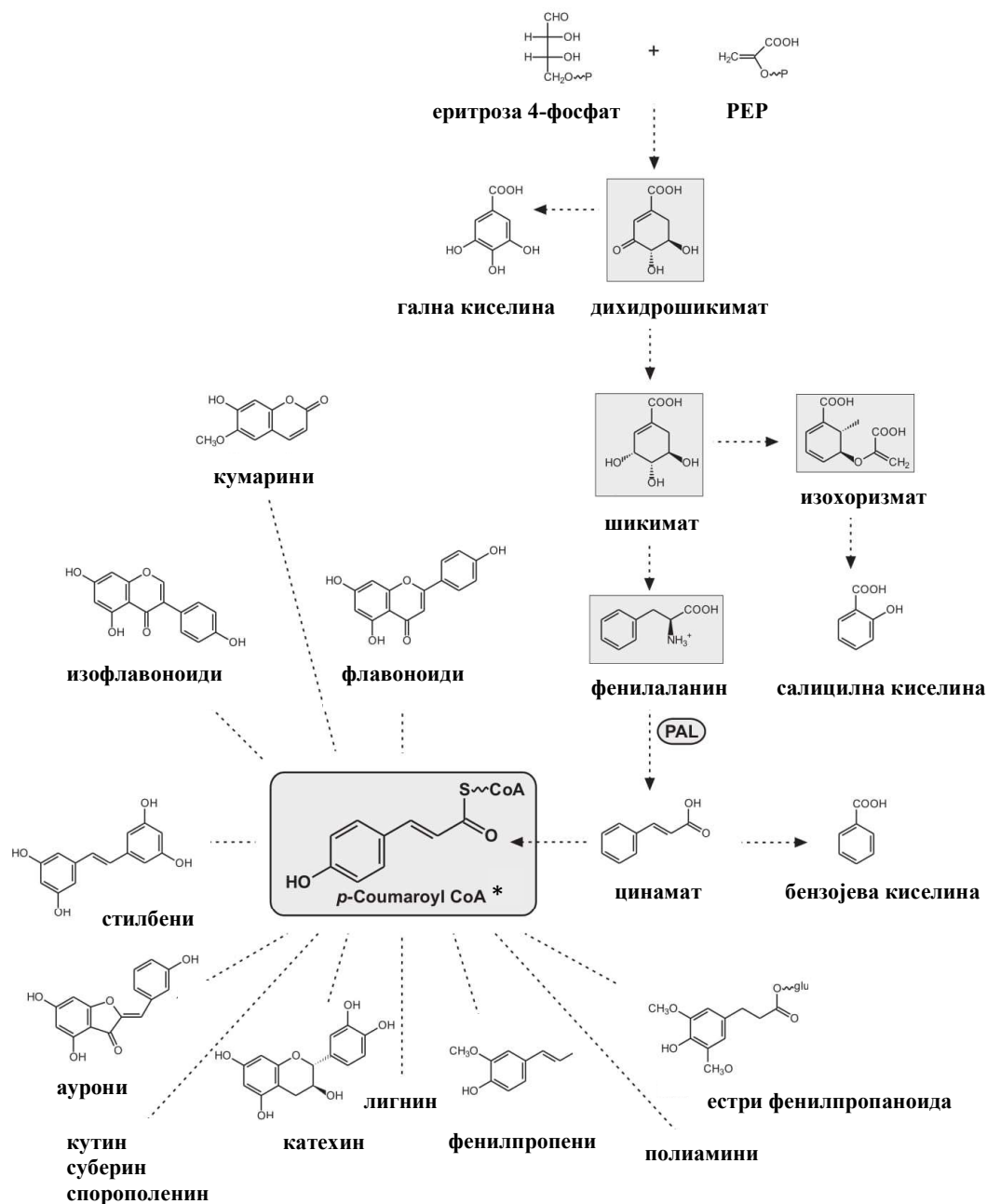
Иако је код *Arabidopsis* sp. утврђено присуство PAL1, PAL2, PAL3 и PAL4 гена, за које се показало да су ткивно и развојно специфични, сматра се да PAL1 и PAL2 кодирају главне функције PAL ензима. Код тополе (*Populus* sp.) од укупно 9 откривених гена, један ген је одговоран за формирање лигнина, други за формирање кондензованих танина, а трећи се повезује са цветањем, мада функција овог гена није довољно разјашњена. Код представника фамилије Solanaceae претпоставља се присуство око 20 потенцијалних PAL гена, али је за само један ген утврђена експресија у свим ткивима. И поред недовољне разјашњености генетичког механизма који се налази у основи овог механизма регулације генске експресије, свестрана и прилагодљива контрола преусмеравања продуката шикимског пута у синтезу секундарних метаболита могућа је једино уз адекватно одвијање процеса фотосинтезе (Vogt, 2010; Fraser и Chapple, 2011).

PAL ензим припада суперфамилији аминокиселинских амонијум лиаза/аминомутаза и код дикотиледоних биљака превасходно је задужен за деаминацију фенилаланина, док PAL пореклом од квасаца и неких монокотила, поред фенилаланина, врши деаминацију и тирозина. У природи се PAL јавља као тетрамерни ензим молекулске тежине око 275-330 kDa, при чему се претпоставља да је због вишеструких тетрамерних форми са, донекле различитом молекулском масом, изоелектричном тачком и афинитетом према супстрату, PAL хетеротетрамер. Структурно, PAL је хеликс тип протеина са два структурна сегмента. Један структурни сегмент учвршћује ензим и интереагује са другим хелијским компонентама (овај сегмент је означен као N-терминално проширење), док други сегмент (означен као специфични заштитни домен) контролише активност ензима ограничавајући приступ супстрату (Zhang и Liu, 2015).

За почетне кораке које катализује PAL, цинамат 4-хидроксилаза (C4-H) и 4-кумароил СоА-лигаза (4CL) су неопходне компоненте и чине основу даљег синтетисања метаболита. Настали метаболит *p*-кумароил СоА представља најзначајнију граничну тачку биосинтезе фенилпропаноида код биљака, јер се конвертује у различите ароматичне компоненте, једним именом означене као полифеноли (Слика 9).

На овај начин настаје око 8 000 ароматичних метаболита који су сврстани у различите подкласе (или класе) укључујући кумарине, флавоноиде, антоцијанине, стилбене, лигнине, фенолне киселине и др. Активност PAL је индукована током процеса растења и развића, али и многим спољашњим факторима као што су напад патогена, UV зрачење, недостатак нутријената и други процеси у којима ароматичне компоненте штите биљни организам (Јаковљевић и сар., 2017b; Ваке и сар., 2010).

Контрола PAL активности одвија се посредством неколико механизма укључујући инхибицију продуктом, транскрипциону и транслациону регулацију, посттранслациону инактивацију, субцелуларну компартментацију, али и метаболичку регулацију повратном спрегом. Разумевање механизма који контролишу врсту и количину фенолних једињења синтетизованих под различитим условима и даље представља приоритет у истраживањима (Lattanzio и сар., 2009; Zhang и Liu, 2015).



Слика 9. Различити продукти фенилпропаноидог метаболизма (према Vogt, 2010); звезда (*) означава централни метаболит *p*-кумароил CoA (eng. *p*-Coumaroyl CoA)

6. Синтеза и уклањање реактивних врста кисеоника у примарном метаболизму

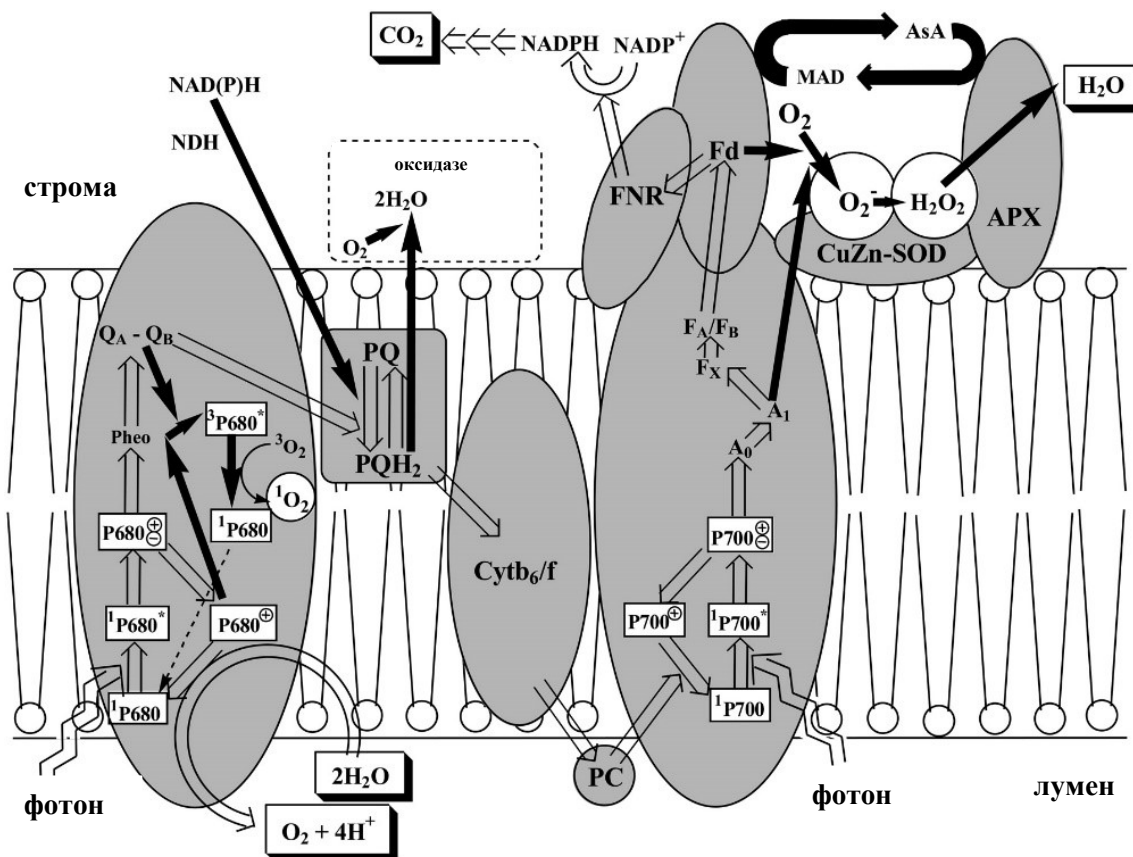
Фотосинтеза је динамичан и флексибилан процес који се одвија у хлоропластима – органелама са високо организованим системом тилакоидних мембрана које садрже све структурне компоненте фотосинтетичког апарата. Под утицајем светлости, фотосинтетички електрон-транспортни ланац (PET) преноси електроне од воде до NADP стварајући протонски градијент који омогућава синтезу АТР. Већи део електрона прати линеарни, нециклични транспорт од воде до фотосистема II (PSII), цитохромског комплекса *b₆/f* и фотосистема I (PSI) до NADP, доводећи до стварања NADPH и АТР. Мањи број електрона се укључује у циклични транспорт у коме је фаворизована синтеза АТР над NADPH. Кисеоник, који се генерише у хлоропластима током овог процеса, може прихватити електроне који пролазе кроз фотосистеме, што резултира настанком реактивних врста кисеоника (ROS). На тај начин, реакциони центри PSI и PSII у тилакоидима хлоропласта, као и PET, неопходни за процес фотосинтезе, чине хлоропласте главним изворима реактивних врста кисеоника (Gill и Tuteja, 2010; Foyer и Shigeoka, 2011).

Једна од основних карактеристика PSII је да лако подлеже оштећењима од стране светлости. Недовољна дисипација светлосне енергије током фотосинтезе може довести до формирања триплет стања хлорофила, тј. реакционог центра (³P680^{*}). Хлорофили у овом триплет стању могу реаговати са триплетом кисеоника (³O₂), што за последицу има стварање синглет кисеоника (¹O₂) у реакционом центру овог фотосистема. Ова осетљивост протеина реакционог центра P680 узрокује његово обнављање на сваких 30 минута, чак и при светлости ниског интензитета. Оштећења и обнављања се дешавају при готово свим интензитетима светлости, а лимитирање PET функције се дешава само уколико је оштећење реакционог центра интензивније од могућег обнављања, при чему долази до фотоинхибиције самог процеса фотосинтезе, са изузетно штетним ефектима и на PSI, као и на читав фотосинтетички апарат. Животни век ¹O₂ је око 3 μs и за то време ова реактивна кисеоничка врста је способна да у ћелијама пређе дистанцу од неколико стотина нанометара (Gill и Tuteja, 2010; Foyer и Shigeoka, 2011).

Ефикасна заштита PET подразумева смањивање продукције синглет-кисеоника у PSII, али и уклањање супероксид-анјон радикала (O₂⁻) и водоник-пероксида (H₂O₂) пореклом од PSI.

O₂⁻ је умерено реактивна врста кисеоника са животним веком од 2 до 4 μs, за разлику од H₂O₂ чији је животни век и до 1 ms. Функционисање цикличног транспорта електрона се сматра једним од начина протекције од реактивних врста кисеоника, пошто се енергетски биланс хлоропласта одржава продукцијом АТР која је фаворизована у односу на NADPH. Фоторедукција

молекула кисеоника до супероксид анјон-радикала, па последично и до H_2O на акцепторској страни PSI откривена је 1951. године од стране Милера и први је корак у серији реакција које се означавају као W-W циклус, тј. *циклус вода-вода* (Asada, 1999; Asada, 2006; Foyer и Shigeoka, 2011). Продукција ROS и њихова последична елиминација током фотосинтетичког процеса приказани су на Слици 10.



Слика 10. Продукција реактивних врста кисеоника и њихова елиминација током процеса фотосинтезе (према Asada, 2006)

Супероксид анјон-радикал се од стране ензима супероксид дисмутазе (SOD) преводи у H_2O_2 и O_2 , након чега се H_2O_2 редукује до H_2O и аскорбата (AsA) од стране ензима аскорбат пероксидазе (A-POX). A-POX користи AsA као специфични дозор електрона и врши редукацију H_2O_2 до H_2O уз истовремену генерацију монодехидроаскорбата (MDHA). Настали MDHA бива редукован до AsA или од стране ферредоксина или NADPH уз помоћ хлоропластне MDHA-редуктазе. AsA и GSH су међу најбоље проученим биљним антиоксидантима (Asada, 2006).

Формирање H_2O_2 од стране РЕТ у хлоропластима током фотосинтезе C_3 биљака износи око $4 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$, само делимично приближно количини која се произведе као резултат глиоксилатног циклуса у фотореспирационом путу ($10 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Међутим, H_2O_2 је значајан инхибитор фотосинтетичког процеса, јер чак и при ниској концентрацији може изазвати инхибицију фиксације CO_2 и до 50%. Зато је баланс између продукције и елиминације ROS у хлоропластима строго контролисан процес. Појачана хлоропластна антиоксидативна заштита се показала као један од најбољих система заштите биљака од абиотичког стреса. Ефикаснијим уклањањем ROS фотосинтетички процес је мање осетљив на промене спољашње средине (Foyer и Noctor, 2003; Asada, 2006; Gill и Tuteja, 2010; Foyer и Shigeoka, 2011).

И поред континуиране хлоропластне продукције, ROS су неизбежни продукти и других ћелијских компартмената са високом метаболичком активношћу или са интензивним протоком електрона. На светлости, поред хлоропласта, пероксисоми су главне органеле које генеришу ROS, док у одсуству светлости, од целокупног кисеоника који је апсорбован, од 1 до 5% се у митохондријама преводи у ROS. Ћелијско окружење митохондрија биљних ћелија је карактеристично због фотосинтезе која доводи до стварања средине богате кисеоником и угљеним хидратима. Респирациони електрон-транспортни ланац митохондрија (ETC) садржи серију мембранских протеинских комплекса (комплекс CI , CII , CIII , CIV) који, заједно са убиквиноном (UQ) и протеином цитохромом c , катализују пренос електрона са NADH и сукцината до O_2 формирајући H_2O . Проток електрона од NADH и сукцината на O_2 повезан је са транслокацијом протона у међумембрански простор, при чему се успоставља електрохемијски градијент неопходан за синтезу АТФ. Комплекси CI и CIII познати су извори O_2^- , чак и при нормалним респираторним условима. Настали O_2^- подлеже дисмутацији до H_2O_2 од стране SOD. H_2O_2 може реаговати са редукованим Fe^{2+} и Cu^+ при чему настаје високо реаактивни и изузетно токсичан хидроксил-радикал ($\text{OH}\cdot$) који може довести до формирања цитотоксичних липидних алдехида, алкена и хидроксиалкена (4-хидрокси-2-ноненал и малондиалдехид (MDA)). Ови продукти изазивају оштећења реагујући са протеинима, другим липидима и нуклеинским киселинама. Помоћу система за дисипацију енергије митохондрије биљних ћелија могу контролисати генерисање реактивних кисеоничких врста, па имају и изузетно важну улогу у адаптацији биљака на услове оксидативног стреса на ћелијском нивоу (Gill и Tuteja, 2010).

Као и митохондрије и хлоропласти, и пероксисоми продукују O_2^- радикал који настаје као последица њиховог нормалног метаболизма. У овим органелама су до сада утврђене две локације на којима долази до генерисања O_2^- и то у матриксу пероксисома (где ксантин-оксидаза (XOD) катализује оксидацију ксантина и хипоксантина до мокраћне (уринске) киселине) и у ETC

мембрани пероксизома. Поред O_2^- , у пероксизомима се генерише и H_2O_2 приликом фотореспирације и β -оксидације масних киселина (Gill и Tuteja, 2010). Додатно, ROS се генерише и посредством рада рН-зависних пероксидаза, оксидаза ћелијског зида и полиамин оксидаза које углавном генеришу H_2O_2 . Током стреса липоксигеназе ћелијског зида могу продуковати O_2^- , $OH^\cdot$, H_2O_2 и 1O_2 . Плазмамембранске NADPH-зависне оксигеназе, током транспорта електрона од цитосолне NADPH до O_2 , продукују O_2^- који се или спонтано, или посредством SOD, дисмутира до H_2O_2 . Такође, забележена је продукција реактивних врста кисеоника и од стране ендоплазматичног ретикулума (Das и Roychoudhury, 2014).

Антиоксидативни систем не уклања у потпуности ROS. Највероватније је да се координацијом процеса продукције и елиминације ROS у ћелијској средини омогућавају адекватне сигналне реакције одбрамбеног система током стреса, укључујући активацију ензима и генску експресију (Asada, 2006; Foyer и Noctor, 2003; Gill и Tuteja, 2010; Foyer и Shigeoka, 2011). Реактивне врсте кисеоника настају не само током координисаних метаболичких путева у ћелијским компартментима (укључујући хлоропласте, митохондрије, пероксизоми, ћелијски зид, апопласт, плазмамембрану и ендоплазматични ретикулум), већ и као резултат абиотичких и биотичких фактора стреса. На тај начин је еквилибријум између продукције и уклањања реактивних врста кисеоника угрожен многобројним факторима стреса попут салинитета, ултравиолетног зрачења, екстремних температура, депривације нутријентима, нападом патогена, хербицидима итд. Ово нарушавање равнотеже изазива оксидативни стрес, тј. стање које прати значајан дисбаланс између продукције ROS и антиоксидативне одбране. Повећање интрацелуларне концентрације реактивних врста може довести до значајних оштећења угљених хидрата, нуклеинских киселина, оксидације протеина и липидне пероксидације, што на крају резултира оксидативним стресом. Како би се заштитиле од ових токсичних интермедијарних продуката, биљне ћелије и њихове органеле укључују одбрамбени систем чије компоненте могу бити ензимске (SOD, CAT, APOX, GPX ..) и не-ензимске које укључују аскорбинску киселину, токофероле, каротеноиде, фенолне киселине, флавоноиде и друге (Gill и Tuteja, 2010; Şen, 2012).

6.1. Ензимске компоненте антиоксидативне заштите

Супероксид дисмутаза (SOD) припада фамилији металоензима. Овај свеприсутни ензим аеробних организама један је од најефикаснијих ензима чија је основна улога спречавање формирања $\text{OH}\cdot$ преко Хабер-Веисове реакције. У процесу дисмутације O_2^- катализоване од стране SOD учествују два молекула ове реактивне кисеоничне врсте. Један молекул O_2^- редукује се до H_2O_2 , а други молекул O_2^- оксидује се до O_2 . На основу типа металног кофактора, SOD се може класификовати на три форме: бакар/цинк супероксид дисмутаза (Cu/Zn-SOD) локализована у цитосолу, пероксизомима и хлоропластима; манган супероксид дисмутаза (Mn-SOD) локализована у митохондријама, и гвожђе супероксид дисмутаза (Fe-SOD) локализована у хлоропластима. Специфична регулација активности појединачних форми у тесној је вези са факторима стреса и има кључну улогу у преживљавању неповољних услова (Gill и Tuteja, 2010; Das и Roychoudhury, 2014). Протективна улога овог ензима код босиљка забележена је у случају стреса изазваног тешким металима, високом концентрацијом бора, ниским температурама, нутријентима и солима (Rai и сар., 2004; Wongsheree и сар., 2009; Landi и сар., 2013; Jakovljević и сар., 2017a; Jakovljević и сар., 2017b).

Каталазе (CAT) су тетрамерни хем-протеини који катализују дисмутацију H_2O_2 до H_2O и O_2 . Карактеришу се високим афинитетом према H_2O_2 и највишом стопом дисмутације (један молекул CAT може конвертовати око 6×10^6 молекула H_2O_2 за један минут). Како су главна места продукције H_2O_2 пероксизоми током оксидације масних киселина, фотореспирације и метаболизма пурина, CAT је доминантно активан у пероксизомима. Међутим, CAT може бити активан и у другим ћелијским компартментима, при чему су изоформе овог ензима независно регулисане. Изоформе *CAT1* и *CAT2* су, осим у пероксизомима, локализоване и у цитосолу, при чему је изоформа *CAT1* активна у полену и семенима, док је *CAT2* доминантно активна у фотосинтетичком ткиву, али може бити активна и у корену и семенима. *CAT3* изоформа је локализована у митохондријама васкуларног ткива и листова (Gill и Tuteja, 2010; Das и Roychoudhury, 2014). Антиоксидативна улога каталазе у условима стреса код босиљка евидентирана је приликом стресних услова индукованих нутријентима, солима, тешким металима, водном дефициту (Rai и сар., 2004; Wongsheree и сар., 2009; Heidari и Golpayegani, 2012; Landi и сар., 2013; Jakovljević и сар., 2017a; Jakovljević и сар., 2017b).

Аскорбат пероксидазе (A POX) су оксидоредуктазе које припадају класи I пероксидаза (интрацелуларне пероксидазе). Основна функција ових ензима је уклањање H_2O_2 у AsA-GSH

циклусу, при чему се користи AsA као доноар електрона. У биљним ћелијама утврђено је присуство неколико изоформи A POX – у цитосолу (cA POX), у строми (sA POX) и тилакоидној мембрани хлоропласта (tA POX), у глиоксизомима и пероксизомима (mA POX) и митохондријама (mitA POX). Класификација је извршена на основу локализације и присуства различитих аминокиселина (Shigeoka *i sar.*, 2002). Како има већи афинитет за H₂O₂ од каталаза и других пероксидаза, сматра се да има круцијалну улогу у уклањању ове реактивне врсте, али је образац активности условљен таксономском припадношћу биљног организма и факторима који доводе до оксидативног стреса (Gill и Tuteja, 2010; Das и Roychoudhury, 2014).

Класа III пероксидаза (мултигенска фамилија пероксидаза) обухвата хем-ензиме чије изоформе могу варирати у више од 50% аминокиселинских секвенци. Ове оксидоредуктазе катализују оксидацију различитих група органских компоненти, при чему користе ароматична једињења као доноаре електрона и H₂O₂ као крајњи акцептор електрона (гвајакол пероксидазе (G POX) користе гвајакол, док пирогалол пероксидазе (P POX) користе пирогалол као доноаре електрона). Ови ензими су, поред заштите од оксидативног оштећења коју остварују уклањањем H₂O₂, укључени у многе метаболичке процесе као што су катаболизам ауксина, биосинтеза лигнина посредством оксидације циметних алкохола пре њихове полимеризације у лигнин и суберин, одбране од предатора итд. Локализовани су интрацелуларно (у цитосолу и вакуоли) и у ћелијском зиду и екстрацелуларном простору. Како се главне функције пероксидаза везаних за ћелијски зид одвијају у апопласту, изоформе ових ензима представљају значајан регулаторни фактор ћелијске елонгације и раста. Попут осталих ензимских компоненти одбрамбеног система, и активност ових ензима је просторно и временски различита, а додатно је условљена и факторима спољашње средине (Quiroga *i sar.*, 2000; Gill и Tuteja, 2010; Kukavica *i sar.*, 2013; Das и Roychoudhury, 2014).

Протективна улога антиоксидативних ензима из групе пероксидаза код босиљка је вишеструко потврђена, и то у случају стреса изазваног дефицитом или вишком минералних елемената, различитим изворима соног стреса, водном дефициту и тешким металима (Rai *i sar.*, 2004; Tarchoune *i sar.*, 2010; Tarchoune *i sar.*, 2012a; Tarchoune *i sar.*, 2012b; Heidari и Golpayegani, 2012; Landi *i sar.*, 2013; Jakovljević *i sar.*, 2017a; Jakovljević *i sar.*, 2017b).

Монодехидроаскорбат редуктаза (MDHAR), дехидроаскорбат редуктаза (DHAR) и глутатион редуктаза (GR) такође су компоненте ензимске заштите које, у координацији са осталим ензимима, пружају заштиту од оксидативних оштећења.

6.2. Не-ензимске компоненте антиоксидативне заштите

Поред ензимске антиоксидативне заштите, процес уклањања реактивних врста кисеоника обавља се и посредством не-ензимских компоненти биљног одбрамбеног система. У не-ензимске компоненте одбране од оксидативног стреса убрајају се аскорбинска киселина, каротеноиди, пролин, фенолне супстанце, шећери и полиамини.

Каротеноиди су липосолубилна изопреноидна једињења чије су биолошке улоге и активности одређене јединственом хемијском структуром. Око 600 различитих каротеноида је заступљено код виших биљака. У основи већине каротеноида је скелет од 40 угљеникових атома (са коњугованим двоструким везама) на чијим крајевима се могу налазити цикличне крајње групе које могу бити супституисане функционалним групама које садрже кисеоник. Основне функције ових пигмената јесу апсорпција светлости таласних дужина 400-550 nm и пренос до хлорофила (помоћна улога у апсорбовању светлости), као и заштита биљних ћелија уклањањем слободних радикала (антиоксидативна функција). Образац заступљености коњугованих двоструких веза одређује способност каротеноида за апсорбовање светлости и утиче на њихову антиоксидативну активност. Антиоксидативна активност каротеноида заснива се на њиховој способности неутрализације синглет кисеоника и хидроксил-радикала. Синтеза ових биљних пигмената је индукована различитим стресорима укључујући соли, зрачење и недостатак нутријената (Stahl и Sies, 2003; Polesskaya и сар., 2004; Polesskaya и сар., 2006; McElroy и Kopsell, 2009; Gill и Tuteja, 2010; Nisar и сар., 2015; Hou и сар., 2016).

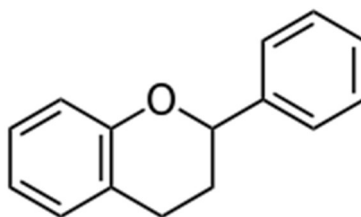
Секундарни метаболити сврставају се међу најзначајније не-ензимске компоненте одбрамбеног система биљака. Ови молекули као продукти секундарног метаболизма биљака имају значајну улогу у одговору на абиотичке и биотичке факторе стреса.

Генерално, ова једињења су деривати изопреноидних, фенилпропаноидних, алкалоидних или путева масних киселина. Биљни полифеноли из групе терпеноида синтетишу се из прекурсора изопентенил-дифосфата. Алкалоиди настају углавном од аминокиселина, док су биљна фенолна једињења или продукти пута шикимске киселине или мевалонске киселине. Пут шикимске киселине преобладајући је код виших биљака у односу на пут мевалонске киселине, који је значајнији за синтезу бактеријских метаболита и метаболита гљива (Manach и сар., 2004; Mandal и сар., 2010).

Међу секундарним метаболитима неколико хиљада молекула се карактерише полифенолном структуром, тј. ароматичним прстеном са неколико хидроксилних група. Најшире употребљавана класификација фенолних једињења је на основу броја атома угљеника у основном молекулском скелету (Robards, 1999; Stanković, 2012). Према овој класификацији разликују се следећа фенолна једињења:

- јединствени, прости феноли (C_6)
- фенолне киселине (C_6-C_1)
- фенилсирћетне киселине (C_6-C_2)
- фенилпропени, кумарини, хромони (C_6-C_3)
- нафтихинони (C_6-C_4)
- ксантони ($C_6-C_1-C_6$)
- стилбени, антрахинони ($C_6-C_2-C_6$)
- флавоноиди ($C_6-C_3-C_6$)
- лигнини ($(C_6-C_3)_2$)
- бифлавоноиди ($(C_6-C_3-C_6)_2$)

Флавоноиди (Слика 11) су секундарни метаболити лоцирани у вакуолама биљних ћелија и представљају деривате 2-фенил-бензил- γ -пирона чији биосинтетички пут (део фенилпропаноидног метаболизма) почиње кондензацијом једног *p*-кумароил СоА молекула са три молекула малонил СоА уз настанак халкона (4,2,4,6-тетрахидрохалкон). Следећи корак у синтези флавоноида је изомеризација халкона у флаванон, а од овог корака синтетички пут се грана на неколико различитих класа флавоноида, укључујући ауреоне, дихидрохалконе, изофлавоне, флавоне, флавоноле, леукоантоцијанидине, антоцијанине, проантоцијанидине и др. (Mierziak и сар., 2014).

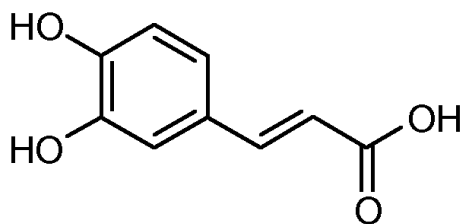


Слика 11. Општа структурна формула флавоноида

Овако настали флавоноиди пролазе даље модификације које су праћене променама у растворљивости, реактивности и стабилности. Због разноврсности у хемијској структури која је последица хетерогености супституената, флавоноиди показују велики број значајних функција код биљака попут заштите од патогена, клијања поленовог зрна, заштите од ултраљубичастог зрачења, антиоксидативне функције итд. Антиоксидативна улога флавоноида заснива се на способности неутрализације слободних радикала, при чему се спречава оштећење ћелија и омогућава прилагођавање биљака различитим условима средине. Ова антиоксидативна улога флавоноида у корелацији је са бројем и положајем хидроксилних група везаних за фенолни прстен (Gill и Tuteja, 2010; Stanković, 2012; Mierziak и сар., 2014).

Фенолне киселине се уграђују у ћелијски зид биљних ћелија као одговор на факторе стреса; фенолпропаноидним путем синтетишу се деривати циметне и бензоеве киселине који се естерификују и уграђују у ћелијски зид. Јестиве биљне врсте углавном садрже малу количину деривата бензоеве киселине (гална, сиригинска, ванилинска, *p*-хидроксибензоева, протокатехинска киселина и друге), како слободних, тако и естерификованих форми, што је уједно и главни разлог недовољног проучавања ових секундарних метаболита. Деривати циметне киселине су знатно заступљенији од деривата бензоеве киселине. Хидроксициметна киселина и деривати хидроксициметне киселине јесу свеprisутне фенолне компоненте чија су проучавања интензивирани, пре свега због значајних биолошких активности која ова једињења показују. Међу најзначајнијим члановима фамилије хидроксициметних киселина је и кофеинска киселина (Manach, 2004; Stanković, 2012; Gaglione и сар., 2013).

Кофеинска киселина (Слика 12), тј. 3,4-дихидроциметна киселина, је најзаступљенија међу хидроксициметним дериватима фенолних киселина и представља између 75% и 100% укупног садржаја хидроксициметних киселина. У биљним ћелијама може бити присутна како у слободном, тако и у естерификованом облику.

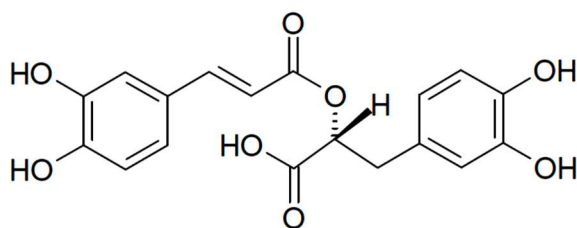


Слика 12. Структурна формула кофеинске киселине

Потврђено је да кофеинска киселина, како у слободном, тако и у естерификованом облику, показује антидијабетска, антиканцерогена, антивирална и антидепресивна својства (Takeda и сар., 2002; Chung и сар., 2004; Okutan и сар., 2005; Gülçin, 2006; Wang и сар., 2009; Sato и сар., 2011). Међу најзначајније деривате кофеинске киселине убрајају се хлорогена, каftarинска и ферулинска киселина.

Рузмаринска киселина (Слика 13) је естар кофеинске киселине (3,4-дихидроксициметна киселина) и 3,4-дихидроксифенилмљечне киселине. Први пут је изолована и структурно описана од стране Scarpati и Orientere (1958) из врсте *Rosmarinus officinalis* L.. Код представника фамилија Lamiaceae и Boraginaceae рузмаринска киселина је један од најчешће заступљених естара кофеинске киселине. Прекурсори за синтезу су аминокиселине фенилаланин и тирозин, али се претпоставља постојање неколико различитих путева синтезе рузмаринске киселине (Landmann и сар., 2011).

Према Petersen и сар. (1993) први корак синтетичког пута праћен је конверзијом фенилаланина у 4-кумароил CoA. Ова реакција је катализована од стране фенилаланин амонијум лиаза (PAL), *trans*-цинамат 4-хидроксилаза (C4H) и 4-кумарат-CoA лигаза (4CL). У другој „грани“ овог синтетичког процеса формира се 4-хидроксифенилпируват (pHPP) посредством пиридоксалфосфат-зависне тирозин аминок-трансферазе (ТАТ) из тирозина. Формирани pHPP се помоћу 4-хидроксифенилпируват редуктазе (HPPR) редукује до 4-хидроксифениллактата уз коришћење NADH или NADPH. Специфична хидроксициметна трансфераза (синтаза рузмаринске киселине (RAS)), врши трансфер 4-кумароил дела из 4-кумароил Co-A до алифатичне OH-групе 4-хидрокси фениллактата уз ослобађање CoA и образовање 4-кумароил-4-хидроксифениллактата. Два слична ензима, 4-кумароил-4'-хидроксифениллактат 3-хидроксилаза и 4-кумароил-4'-хидроксифениллактат 3'-хидроксилаза мењају 4-кумароил-4-хидроксифениллактат, а рузмаринска киселина, као крајњи продукт, настаје дејством кафеил-4-хидроксифениллактат 3-хидроксилазе и 4-кумароил-3,4-дихидроксифениллактат-3-хидроксилазе (Petersen и сар., 2009; Perić, 2014).



Слика 13. Структурна формула рузмаринске киселине (преузето из Perić, 2014)

Рузмаринска киселина показује значајне биолошке активности, попут антиоксидативне, антиинфламаторне, нефропротективне, цитотоксичне, антимикробне, антиалергијске и др. (Erkan и сар., 2008; Domitrović и сар., 2014; Zhu и сар., 2014; Adomako-Bonsu и сар., 2017; Chaowuttikul и сар., 2018), па је због широког спектра биоактивности све већи интерес за употребу ове фенолне киселине. Додатно, истраживања последњих година указују на значајно виши ниво продукције рузмаринске киселине у условима *in vitro* (Petersen, 2013).

Способност неутрализације слободних радикала, тј. антиоксидативни капацитет секундарних метаболита, у вези је са њиховом хемијском структуром, при чему је утврђено да су полимерни полифеноли снажнији антиоксиданси у односу на просте, мономерне феноле. Виши степен полимеризације омогућава бољу способност неутрализације реактивних врста кисеоника, инхибира липидну пероксидацију и омогућава бољу редукцију метала (Moure и сар., 2001).

Као и већина представника фамилије Lamiaceae и врсте рода *Ocimum* карактерише присуство значајне количине секундарних метаболита из групе фенолних једињења. Претходним истраживањима је потврђена висока концентрација фенолних једињења код различитих сорти босилка. Међу најзаступљенијим фенолним киселинама су, пре свега, рузмаринска и кофеинска, а затим и кафтаринска и цихорна киселина, при чему су наведене фенолне киселине заступљене у високим концентрацијама и значајно доприносе антиоксидативним карактеристикама. Осим фенолних једињења из класе фенолних киселина, представнике рода *Ocimum* карактерише и висока концентрација секундарних метаболита из класе флавоноида, при чему су код сорти љубичастог босилка флавоноиди из групе антоцијанина заступљени у високим концентрацијама (Javanmardi и сар., 2002; Lee и Scagel, 2009; Kwee и Niemeyer, 2011; Flanigan и Niemeyer, 2014; Ghasemzadeh и сар., 2016).

7. Примена културе ткива у проучавању босиљка

Биљне врсте су константно изложене различитим факторима стреса попут повећаног салинитета, суше, поремећаја у минералној исхрани, радијацији, патогенима, тешким металима и др. Примарни одговор биљака на најраније негативне утицаје ових фактора стреса огледа се у хиперпродукцији реактивних врста кисеоника, тако да способност биљака да превазиђу оксидативни стрес зависи углавном од ефикасности ензимских и не-ензимских компоненти антиоксидативног система. Међутим, антиоксидативни капацитет и толеранција на факторе стреса значајно варирају међу различитим биљним врстама, као и међу различитим генотиповима истих биљних врста. Испитивање одговора биљака на факторе стреса додатно је отежано и теренским условима, имајући у виду комплекс еколошких фактора који делују на биљни организам (Mir и сар., 2015; Kalisz и сар., 2016; Vacha и сар., 2017).

Асептична култура биљног ткива (култура биљних ћелија, ткива и органа) или култура биљака *in vitro* подразумева гајење и умножавање ћелија, ткива и органа на чврстом или течном медијуму у стерилним и контролисаним условима. Због тотипотентности, односно плурипотентности биљних ћелија, култура ткива се може применити готово за сваку биљну врсту, како за масовну производњу тако и за очување гермплазме, добијање униформних потомака, проучавање физиолошких и биохемијских процеса код биљака итд. Такође, због могућности проучавања великог броја узорака на малом простору и у кратком временском интервалу, уз потпуну контролу услова средине, *in vitro* култура ткива се последњих година употребљава и за проучавање ROS хомеостазе код биљака. На овај начин је омогућено праћење јединственог и комплексног одговора биљног организма на појединачне срединске факторе. Различити типови *in vitro* техника могу се користити не само за праћење реакција биљног организма на абиотички и биотички стрес, већ и за стварање *in vitro* модел система за праћење морфолошких, физиолошких и биохемијских промена и примарног и секундарног метаболизма како у култури клијанаца, тако и у култури калуса, микропропагацији, култури читаве биљке, аксиларних изданака и других метода (Şen, 2012).

Како је утврђено да постоји корелација између толеранције на стрес и антиоксидативног одговора биљке, значајна примена *in vitro* културе ткива је и селекција одговарајућих толерантних генотипова праћењем одговора биљака на факторе стреса. Као метод користи се карактеризација толерантности на основу одговора антиоксидативног одбрамбеног система детектовањем активности ензимских антиоксиданаса (SOD, CAT, различите групе пероксидаза и др.) и не-

ензимских антиоксиданаса (попут каротеноида и фенолних киселина) и других маркера стреса као што су концентрације H_2O_2 и MDA (Şen, 2012; Dias и сар., 2018).

Култура клијанаца и антиоксидативни одговор клијанаца коришћени су као метод за селекцију толерантних генотипова врста *Paulownia imperialis* and *Paulownia fortunei* (Ayala-Astorga и Alcaraz-Melendez, 2010), *Olea europaea* (Valderrama и сар., 2006), *Solanum tuberosum* (Srinieng и сар., 2015), *Ocimum basilicum* (Jakovljević и сар., 2017a).

Највећи број истраживања представника рода *Ocimum* усмерен је, пре свега, на квантитативне и квалитативне разлике сорти у погледу квантитета етарских уља или идентификовања хемотипова на основу квалитативних карактеристика етарских уља (Graye и сар., 1996; Lee и сар., 2005; Politeo и сар., 2007; Hussain и сар., 2016), при чему постоје значајна варирања у добијеним резултатима, првенствено због порекла узорака, услова култивације и фактора спољашње средине. Такође, претходним истраживањима у контролисаним условима утврђено је присуство различитих фенолних киселина и висока антиоксидативна активност. Међутим, ове студије су спроведене коришћењем конвенционалних биљних засада, у стакленицима или у хидропоничних система. За скрининг и детаљна проучавања великог броја генотипова који постоје у оквиру рода *Ocimum* употреба конвенционалних засада је обимна техника која захтева висока финансијска улагања. Зато је за испитивање представника рода *Ocimum* неопходно успостављање система којим се може управљати на мањим просторима (Srivastava и сар., 2014). И поред тога што су комерцијално међу најшире употребљаваним врстама, представници рода *Ocimum* недовољно су испитивани *in vitro*. Подаци који постоје о *in vitro* култури босиљка односе се, пре свега, на микропропацију различитим типовима екпланата на Murashige Skoog (MS) подлози (Pattnaik и Chand, 1996; Sahoo и сар., 1997; Singh и Sehgal, 1999; Dode и сар., 2003; Siddique и Anis, 2008; Shilpa и сар., 2010) и културу калуса (Hakim и сар., 2007). Srivastava и сар. (2014) и Bhuvaneshwari и сар. (2016) указују на то да се у *in vitro* условима може добити значајно већа количина секундарних метаболита пореклом из босиљка.

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Прегледом резултата истраживања интраспецијске варијабилности босилка – *Ocimum basilicum* L. утврђено је да се анализе првенствено односе на морфолошке и анатомске разлике, као и разлике у погледу хемијских и биолошких особина хербе. Највећи број истраживања усмерен је на квантитативне и квалитативне разлике у погледу квантитета етарских уља или идентификовања хемотипова на основу квалитативних карактеристика етарских уља. Интраспецијске разлике у физиолошким одговорима на факторе стреса током јувенилне фазе животних циклуса различитих генотипова босилка до сада нису проучаване.

Имајући у виду чињеницу да стресни услови спољашње средине изазивају најраније одговоре још у првим фазама растења и развића биљака, испитивање физиолошких и биохемијских одговора клијанаца различитих субспецијских таксона на исте услове стреса може дати увид у степен интраспецијских разлика унутрашњег, физиолошког одговора јувенилних биљних организама. Додатно, оваква сазнања омогућавају и утврђивање степена условљености биљног метаболизма на каснијим ступњевима растења и развића са најранијим превазилажењима неповољних услова.

На основу тога, постављени су следећи циљеви истраживања:

- Увођење генотипова *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* L., *Ocimum basilicum* L. var. *basilicum* L., *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth. и *Ocimum x citriodorum* Vis. у *in vitro* услове;
- Формирање система за праћење физиолошких и биохемијских промена током растења и развића кроз успостављање културе клијанаца одабраних генотипова;
- Утврђивање деловања количине доступних нутријената и форме доступног азота на карактеристике клијања и примарни метаболизам одабраних генотипова босилка;
- Утврђивање интраспецијских разлика у физиолошким одговорима на оксидативни стрес изазван нутритивном депривацијом;

- Испитивање путева синтезе секундарних метаболита и степена повезаности примарног и секундарног метаболизма босиљка у условима нутритивне депривације;
- Одређивање интраспецијске варијабилности у количини укупних фенолних једињења, количини флавоноида и укупној антиоксидативној активности услед стреса изазваног нутритивном депривацијом;
- Утврђивање квалитативних разлика у продукцији најзаступљенијих биоактивних једињења у биљном материјалу квантификацијом одабраних секундарних метаболита;
- Дефинисање прецизних нутритивних захтева појединачних генотипова.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА

Експериментални део истраживања реализован је у Лабораторији за физиологију биљака Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу. Део експеримената који је захтевао асептичне услове реализован је у Лабораторији за микробиологију Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

1. Идентификација биљног материјала

Као полазни материјал коришћена су семена комерцијално најексплоатисанијих сорти босиља у Србији, означених као ситнолисни босиљак, љубичасти босиљак, лимунски босиљак и крупнолисни Genovese босиљак (произвођачи „Семесемена“, Београд и „НС семе“, Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад). Идентификација наведених сорти извршена је у Лабораторији за физиологију биљака, у огледу са земљиштем као супстратом, и то применом DUS теста (*eng. Distinctiveness, Uniformity and Stability test*). Применом овог теста особености, униформности и стабилности могуће је утврдити разлике између генотипова, при чему се идентификација врши на основу квалитативних и квантитативних особина и фенотипских маркера (карактеристике стабљике, листа и цвасти) у складу са одредбама UPOV-а (Међународна Унија за заштиту нових биљних сорти, 2003).

Наведеним анализирањем идентификовани су следећи генотипови:

- ситнолисни босиљак – *Ocimum basilicum* L. var. *minimum* L.
- љубичасти босиљак – *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth. (сорта Dark Opal)
- лимунски босиљак – *Ocimum* x *citriodorum* Vis.
- крупнолисни босиљак – *Ocimum basilicum* L. var. *basilicum* L. (сорта Genovese).

Семена наведених генотипова босиља коришћена су у даљим истраживањима.

2. Дизајн експеримената

I Услед недовољне количине података о оптималним условима за успостављање *in vitro* културе ткива код изабраних представника рода *Ocimum*, као ни о нутритивним захтевима појединачних генотипова, први део експеримената је подразумевао увођење наведених представника босиљка у *in vitro* услове, а након тога и успостављање културе клијанаца као модел система за праћење физиолошког одговора јувенилних стадијума босиљка. Како је салинитет један од најинтензивнијих абиотичких фактора, са јасним и изразитим утицајем и на морфолошке и на физиолошке промене код биљака, семена генотипа *Ocimum basilicum* var. *minimum* асептично су засејана на стандардни хранљиви медијум Murashige и Skoog (1962) уз додатак натријум хлорида у концентрацијама од 10, 20 и 30 mM. Клијанци гајени на Murashige и Skoog (MS) медијуму без натријум хлорида сматрани су контролом. За све третмане асептично, у ламинарној комори, засејано је 1-2 семена на 10 ml подлоге, у епруветама запремине 25 ml. Седмог, четрнаестог, двадесетпрвог и двадесетосмог дана од засејавања вршено је узорковање материјала. Непосредно након узорковања мерена је свежа маса клијанаца, дужина изданака, дужина корена, извршена је екстракција ензима и мерена је активност ензима супероксид дисмутаза, каталаза, гвајакол пероксидаза и пирогалол пероксидаза, како у изданцима тако и у корену.

Овај тип експеримента представља евалуацију културе клијанаца босиљка као потенцијално погодног модел система за детекцију раних физиолошких одговора јувенилних биљака на континуиране и дуготрајне стресне факторе.

II Друга група експеримената обухватала је испитивање утицаја квантитативног и квалитативног састава минералне исхране на физиолошке одговоре различитих генотипова босиљка у јувенилним фазама, у *in vitro* условима. Третмани су укључивали различите концентрације минералних елемената са KNO_3 као главним извором азота (третмани 1a, 2a и 3a) и различите концентрације минералних елемената, али са KNO_3 и NH_4NO_3 као изворима азота (третмани 1b, 2b и 3b). За сва четири генотипа босиљка (*Ocimum basilicum* var. *minimum*, *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal и *Ocimum x citriodorum*) одређиване су карактеристике клијања, мерена је концентрација фотосинтетичких пигмената, концентрација укупних солубилних протеина, активност антиоксидативних ензима (супероксид дисмутаза, каталаза, аскорбат пероксидаза, гвајакол пероксидаза, пирогалол пероксидаза), активност ензима фенилаланин амонијум лиаза, одређиван је садржај укупних фенолних једињења,

количина флавоноида, квантификација фенолних киселина, као и укупна антиоксидативна активност у изданцима и корену.

3. *In vitro* култура клијанаца

За успостављање *in vitro* културе клијанаца босилка најпре је било потребно утврдити најефикаснији начин површинске стерилизације семена босилка који, поред успешног уклањања површинске микрофлоре семена, омогућава и дугорочно одржавање клијанаца у асептичним условима. Пошто је један од постављених циљева био и испитивање интраспецијских разлика у најранијим одговорима јувенилних фаза генотипова кроз евидентирање карактеристика клијања *in vitro*, уз истовремено утврђивање састава медијума који ће обезбедити најефикасније клијање, површинска стерилизација семена је нужно морала да обухвати само онај поступак хемијског третирања семена који ни на који начин не шкоди клијању испитиваних семена.

Како у претходним *in vitro* истраживањима босилка не постоје подаци који указују на ефекат средстава за површинску стерилизацију на карактеристике клијања, прелиминарна испитивања подразумевала су примену неколико хемијских средстава за површинску стерилизацију (у различитом односу и у различитој концентрацији) и упоређивање карактеристика клијања у *in vitro* условима са вредностима које су добијене за нетретирана семена (стандардном методом наклијавања, у Петри-кутијама на филтер папиру и у вермикулиту).

Утврђено је да најефикаснији метод површинске стерилизације укључује најпре третирање семена 0.07% фунгицидом чија је активна материја тиофанат-метил (Галеника-фитофармација), затим 70% етанолом и на крају 4% раствором натријум-хипохлорита (NaOCl), уз вишеструко испирање семена у стерилној дестилованој води.

Овакав вид површинске стерилизације ефикасно уклања површинску микрофлору семена босилка, омогућава дугорочно одржавање асептичних услова (преко 95% неконтаминираних клијанаца) и не доводи до значајних разлика у карактеристикама клијања у односу на нетретирана семена која су исклијавана или на филтер папиру или у вермикулиту. Исти поступак се показао успешним за све испитиване генотипове и коришћен је у даљем раду.

Асептично засејавање семена вршено је у ламинарној комори са вертикалним струјањем ваздуха и филтерима који пречишћавају ваздух, уз коришћење стерилног прибора за рад. Све хранљиве подлоге стерилисане су у аутоклаву у трајању од 20 min на температури од 121 °C. Материјал од стакла и инструменти коришћени за манипулацију семенима стерилисани су у сувом

стерилизатору 90 min на температури од 160 °C. Сва семена су површински стерилисана непосредно пре постављања на медијум. Површинска стерилизација семена вршена је потапањем семена у 70% раствор етанола у трајању од 20 до 30 секунди, након чега су семена неколико пута испрана стерилном дестилованом водом. Даља стерилизација вршена је потапањем семена у 4% раствор натријум хипохлорита (NaOCl) 15-20 min. Након испирања стерилном дестилованом водом, семена су асептично засејана на одговарајући медијум.

Услови за клијање семена и одржавање културе клијанаца прецизно су дефинисани и подразумевали су: температуру 25 ± 2 °C; влажност ваздуха 60-70%; светлост – услови дугог дана (16/8 h светло/мрак). Као извор светлости коришћене су флуоресцентне цеви „Тесла“ Панчево.

3.1. Састав хранљивих медијума

За почетно успостављање културе клијанаца коришћен је стандардни Murashige и Skoog (MS) медијум (1962) са минералним макро- и микронутријентима, витаминима и органским додацима. Састав коришћеног медијума приказан је у Табели 1. У MS медијум је поред 30 g L⁻¹ сахарозе и 7 g L⁻¹ агара додат и натријум хлорид у концентрацијама од 10, 20 и 30 mM L⁻¹. Непосредно пре стерилизације рН вредност медијума је подешена на 5.7-5.8 јединица.

За другу групу експеримената формиране су специфичне подлоге са различитим концентрацијама минералних макро- и микроелемената, комплекса гвожђа, витаминима и органским додацима. Једна од серија подразумевала је различите концентрације наведених елемената са нитратима као основним извором азота (третмани „а“, Табеле 2-4). У другој серији експеримената концентрације наведених елемената су остале непромењене, али је коришћена комбинација нитрата и амонијака као извора азота (третмани „б“, Табеле 5-7).

За сваки од третмана у медијум је додато 7 g L⁻¹ агара и рН вредност медијума је подешена на 5.7-5.8 јединица непосредно пре стерилизације. Јединствени приказ свих медијума коришћених за другу групу експеримената дат је у прилогу.

Табела 1. Састав хранљиве подлоге по Murashige и Skoog-у (1962)

<i>макроелементи</i>	<i>mg L⁻¹</i>
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
<i>микроелементи</i>	<i>mg L⁻¹</i>
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8.6
KJ	0.83
H ₃ Bo ₃	6.20
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
<i>комплекси гвожђа</i>	<i>mg L⁻¹</i>
Na ₂ EDTA	74.5
FeSO ₄ x 7H ₂ O	55.7
<i>витамини</i>	<i>mg L⁻¹</i>
витамин B ₁	0.1
витамин B ₆	0.5
никотинска киселина	0.5
<i>органски додаци</i>	<i>g L⁻¹</i>
казеин-хидролизат	2
мио-инозитол	0.1
сахароза	30
агар	7

Табела 2. Састав третмана 1a

<i>макроелементи</i>	mM L^{-1}
KNO_3	6.18
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
KH_2PO_4	0.25
<i>микроелементи</i>	$\mu\text{M L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	15
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	10
KJ	1.25
H_3Bo_3	12.5
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
<i>комплекси гвожђа</i>	mM L^{-1}
Na_2EDTA	0.025
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.025
<i>витамини</i>	mg L^{-1}
витамин B_1	0.1
витамин B_6	0.5
никотинска киселина	0.5
<i>органски додаци</i>	g L^{-1}
казеин-хидролизат	2
мио-инозитол	0.1
сахароза	7.5
агар	7

Табела 3. Састав третмана 2а

<i>макроелементи</i>	mM L^{-1}
KNO_3	12.36
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
NaH_2PO_4	0.5
<i>микроелементи</i>	$\mu\text{M L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	20
KJ	2.5
H_3Bo_3	25
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.05
<i>комплекси гвожђа</i>	mM L^{-1}
Na_2EDTA	0.05
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
<i>витамини</i>	mg L^{-1}
витамин B_1	0.1
витамин B_6	0.5
никотинска киселина	0.5
<i>органски додаци</i>	g L^{-1}
казеин-хидролизат	2
мио-инозитол	0.1
сахароза	15
агар	7

Табела 4. Састав третмана 3а

<i>макроелементи</i>	mM L^{-1}
KNO_3	24.7
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1
NaH_2PO_4	1
<i>микроелементи</i>	$\mu\text{M L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	60
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	40
KJ	5
H_3Bo_3	50
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
<i>комплекси гвожђа</i>	mM L^{-1}
Na_2EDTA	0.1
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
<i>витамини</i>	mg L^{-1}
витамин B_1	0.1
витамин B_6	0.5
никотинска киселина	0.5
<i>органски додаци</i>	g L^{-1}
казеин-хидролизат	2
мио-инозитол	0.1
сахароза	30
агар	7

Табела 5. Састав третмана 1b

<i>макроелементи</i>	mM L^{-1}
KNO_3	4.7
NH_4NO_3	5.15
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
KH_2PO_4	0.25
<i>микроелементи</i>	$\mu\text{M L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
KJ	1.25
H_3Bo_3	12.5
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
<i>комплекси гвожђа</i>	mM L^{-1}
Na_2EDTA	0.025
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.025
<i>витамини</i>	mg L^{-1}
витамин B_1	0.1
витамин B_6	0.5
никотинска киселина	0.5
<i>органски додаци</i>	g L^{-1}
казеин-хидролизат	2
мио-инозитол	0.1
сахароза	7.5
агар	7

Табела 6. Састав третмана 2b

<i>макроелементи</i>	mM L^{-1}
KNO_3	9.4
NH_4NO_3	10.3
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
KH_2PO_4	0.5
<i>микроелементи</i>	$\mu\text{M L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	20
KJ	2.5
H_3Bo_3	25
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.05
<i>комплекси гвожђа</i>	mM L^{-1}
Na_2EDTA	0.05
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
<i>витамини</i>	mg L^{-1}
витамин B_1	0.1
витамин B_6	0.5
никотинска киселина	0.5
<i>органски додаци</i>	g L^{-1}
казеин-хидролизат	2
мио-инозитол	0.1
сахароза	15
агар	7

Табела 7. Састав третмана 3b

<i>макроелементи</i>	mM L^{-1}
KNO_3	18.8
NH_4NO_3	20.6
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1
KH_2PO_4	1
<i>микроелементи</i>	$\mu\text{M L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	60
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	40
KJ	5
H_3BO_3	50
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
<i>комплекси гвожђа</i>	mM L^{-1}
Na_2EDTA	0.1
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
<i>витамини</i>	mg L^{-1}
витамин B_1	0.1
витамин B_6	0.5
никотинска киселина	0.5
<i>органски додаци</i>	g L^{-1}
казеин-хидролизат	2000
мио-инозитол	0.1
сахароза	30
агар	7

4. Испитивање карактеристика клијања

Семена сваког од коришћених генотипова босиљка сматрана су проклијалим након пробијања семењаче и појаве радикуле дужине најмање 2 mm. За сваки третман асептично је засејано најмање 200 семена, а резултати су добијени након три понављања. Евидентирање проклијалих семена је вршено сваког дана све док укупан број проклијалих семена није био сталан.

Проценат укупно проклијалих семена (GP – *germination percentage*), средње време клијања (MTG – *mean time to germinate*), брзина (RG – *rate of germination*) и униформност клијања (U) израчунати су према Espanany и сар. (2016) и Fernandez и сар. (2015) на основу следећих једначина:

Укупан проценат проклијалих семена

$$GP = \frac{\sum n_p}{\sum n} \times 100$$

n_p = укупан број проклијалих семена

n = укупан број засејаних семена

Средње време клијања

$$MTG = \frac{\sum n_i \times t_i}{\sum n_i}$$

n_i = број новопрклијалих семена у интервалу i

t_i = време од почетка експеримента до временског интервала i (у данима)

Брзина клијања

$$RG = \frac{\sum G}{t}$$

G = проценат проклијалих семена у једнодневним интервалима

t = укупан период клијања семена.

Униформност клијања

$$U = GP/MTG$$

5. Спектрофотометријска квантификација концентрације фотосинтетичких пигмената

За одређивање концентрације фотосинтетичких пигмената коришћен је свеж биљни материјал. Припрема биљног ткива извршена је према Војовић и Стојановић (2005), при чему је 0.5 g свежих листова хомогенизовано уз додатак 10 mL 80% ацетона. Мацерат је профильтриран кроз филтер папир Whatman No. 1 и пребачен у тамне епрувете, након чега је центрифугиран 5 минута при брзини обртаја од 2500 rpm. Непосредно након центрифугирања за супернатанте је одређивана апсорбанца на таласним дужинама $\lambda = 470 \text{ nm}$, $\lambda = 646 \text{ nm}$ и $\lambda = 663 \text{ nm}$.

Концентрације фотосинтетичких пигмената (хлорофил *a* (Chl *a*), хлорофил *b* (Chl *b*) и укупни каротеноиди (*Cx + c*)) израчунате су према следећим формулама (Wellburn, 1994):

$$\text{Chl } a = 12.21 \times A_{663} - 2.81 \times A_{646}$$

$$\text{Chl } b = 20.13 \times A_{646} - 5.03 \times A_{663}$$

$$C x + c = (1000 \times A_{470} - 3.27 \times \text{Chl } a - 104 \times \text{Chl } b) / 198$$

Вредности су израчунате и изражене у односу на свежу масу узорака ($\text{mg g}^{-1} \text{ SM}$).

6. Екстракција и спектрофотометријска квантификација укупних солубилних протеина

Свежи узорци испитиваних генотипова су на леду одвојени на корене и изданке, након чега су хомогенизовани на леду уз додатак хладног пуфера за екстракцију (Mishra и сар., 2013). Пуфер за екстракцију је садржао 50 mM натријум-калијум-фосфатног пуфера, 1 mM EDTA, 2% поливинилпиролидин (PVP) и 0.1% Triton X-100. Хомогенизовани узорци су профильтрирани и пребачени у епандорф тубе након чега су центрифугирани 20-30 минута на 4 °C при брзини обртаја од 12 000 rpm. Центрифугирањем је издвојен доњи слој (талог од органела и ћелијских зидова) и супернатант у коме су се налазили протеини. Издвојени супернатант је на леду пребачен у нове епандорф тубе и чуван на – 80 °C до употребе.

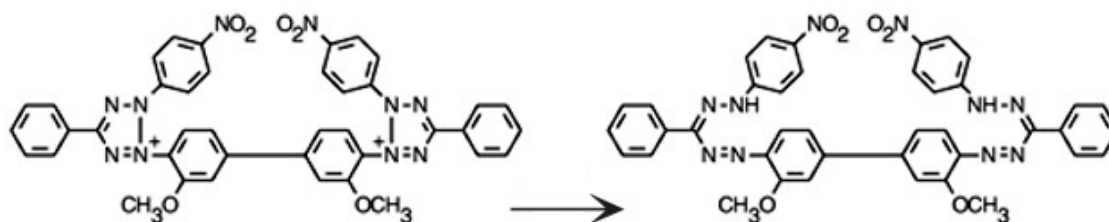
Концентрација укупних солубилних протеина одређена је методом по Lowry-ју (1951). Метода се заснива на мерењу апсорбанце која потиче од два обојена комплекса и то биуретског и редукованог фосфомолибденск-фосфоволфрамовског комплекса, при чему приликом преласка у редуковано стање мењају жуту боју у плаву. Интензитет развијене плаве боје се може прочитати на таласној дужини $\lambda = 750 \text{ nm}$ и пропорционалан је концентрацији протеина.

Реакциона смеша је поред узорака протеина садржала и 2% Na_2CO_3 у 0.1N NaOH и смешу 2% K , Na -тартарата и 1% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Узорци су инкубирани 10 минута на собној температури, након чега је у сваки узорак додато по 0.6 mL Folin-Ciocalteu реагенса. После инкубације од 30 минута вршено је читавање апсорбанци. Исти поступак је поновљен за стандардни раствор говеђег серум албумина (BSA) и конструисана је калибрациона крива. На основу калибрационе криве и вредности измерених апсорбанци, израчуната је концентрација укупних солубилних протеина и изражена према свежој маси биљног материјала ($\text{mg g}^{-1} \text{ SM}$).

7. Испитивање ензимских компоненти одбрамбеног система

7.1. Квантификација активности супероксид дисмутазе

За одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD) коришћена је спектрофотометријска метода према Beauchamp и Fridovich (1971). Метода се заснива на капацитету протеинског екстракта да инхибира фотохемијску редукцију NBT (*eng. nitro-blue tetrazolium*) до формазана (Слика 14), што је праћено бојењем реакционе смеше у плаво.



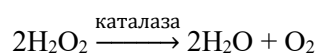
Слика 14. Редукција NBT (*nitro-blue tetrazolium*) и формирање формазана

Реакциона смеша је поред 50 mM натријум-фосфатног пуфера (pH 7.8) садржала и 1mM NBT, 13 mM l-metionin-a, 0.01 M EDTA, 0.2 mM рибофлавина и 0.1 mL протеинског екстракта. Контролни узорак је припреман мешањем реакционе смеше и 0.1 mL пуфера. За сваки третман припремљена су по три узорка. Реакција је иницирана излагањем реакционе смеше осветљењу од 20 W у трајању од 10 минута. Апсорбанца је одређивана на $\lambda = 560 \text{ nm}$.

Једна SOD јединица (U) представља количину ензима која инхибира 50% NBT фоторедукције и изражена је или у односу на свежу масу биљног ткива ($\text{U mg}^{-1} \text{ SM}$) или у односу на концентрацију укупних солубилних протеина ($\text{U mg}^{-1} \text{ proteina}$).

7.2. Квантификација активности каталазе

Разградња водоник-пероксида посредством ензима каталазе (CAT) врши се према следећој једначини:

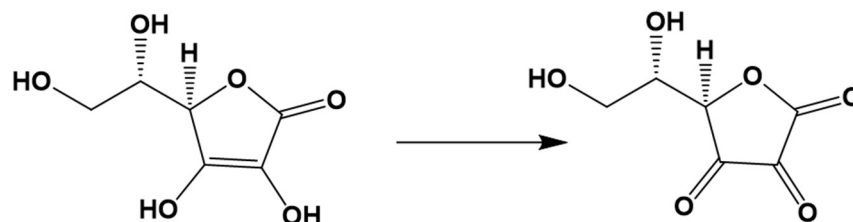


Мерење активности САТ вршено је спектрофотометријском методом према Goth (1991). Метода се заснива на мерењу количине неразграђеног водоник-пероксида који у реакцији са амонијум-молибдатом формира стабилан комплекс са максимумом апсорпције на таласној дужини $\lambda = 405 \text{ nm}$. У узорак протеинског екстракта додат је 60 mM натријум-калијум-фосфатни пуфер (pH 7.4) и 65 $\mu\text{M mL}^{-1}$ H_2O_2 (у фосфатном пуферу). Након инкубације од 60 секунди на 37 °C реакција је заустављена додавањем 1 mL 32.4 mM амонијум-молибдата $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O})$, при чему се формира жуто обојени комплекс молибдата и водоник-пероксида.

Једна САТ јединица (U) представља количину ензима који разгради 1 μmol водоник-пероксида за 60 секунди под наведеним условима. Активност САТ изражена је или у односу на свежу масу биљног ткива ($\text{U mg}^{-1} \text{ SM}$) или у односу на концентрацију укупних солубилних протеина ($\text{U mg}^{-1} \text{ proteina}$).

7.3. Квантификација активности аскорбат пероксидазе

Аскорбат пероксидаза (А POX) редукује H_2O_2 до воде, а као дозор електрона користи аскорбинску киселину која се оксидује до дехидроаскорбинске киселине (Слика 15).



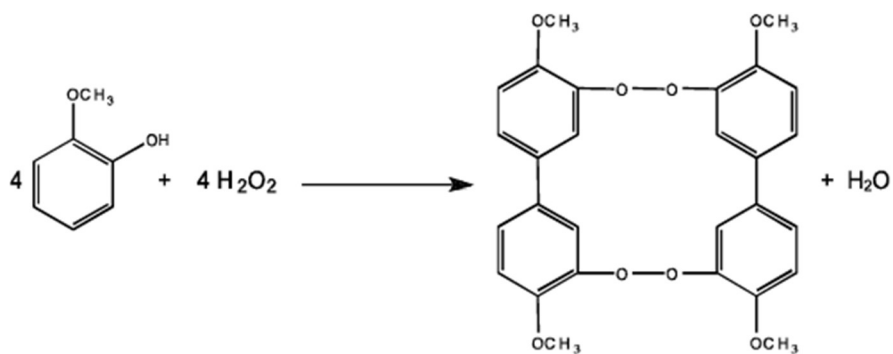
Слика 15. Редукација водоник-пероксида и оксидација аскорбинске киселине до дехидроаскорбинске киселине посредством аскорбат пероксидазе

Квантификација активности А РОХ у протеинским екстрактима свежег биљног материјала вршена је спектрофотометријском методом (Ја и сар., 2013). Реакциона смеша је садржала 50 mM фосфатни пуфер (pH 7), 0.5 mM аскорбинску киселину и 0.1 mM водоник-пероксид. Реакција је иницирана додавањем протеинског екстракта, а промена апсорбанце је праћена на таласној дужини $\lambda = 290 \text{ nm}$ током једног минута. Средње вредности промена апсорбанци су дељене са моларним екстинкцијским коефицијентом за аскорбинску киселину ($\epsilon^{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Мерења су вршена у три понављања.

Једна А РОХ јединица (U) представља количину ензима који разгради 1 μmol водоник-пероксида у јединици времена по јединици биљног материјала у наведеним условима. Специфична активност А РОХ је изражена у односу на концентрацију укупних солубилних протеина ($\text{U mg}^{-1} \text{ proteina}$).

7.4. Квантификација активности гвајакол пероксидазе

Гвајакол пероксидаза (G РОХ) редукује водоник-пероксид до воде при чему користи ароматично једињење гвајакол као дозор електрона. Активношћу гвајакол пероксидазе, гвајакол се оксидује отпуштањем електрона и том приликом прелази у тетрагвајакол. Способност редукције водоник-пероксида од стране гвајакол пероксидазе и формирање тетрагвајакола приказани су на Слици 16.



Слика 16. Редукција водоник-пероксида и оксидација гвајакола у тетрагвајакол посредством гвајакол пероксидазе

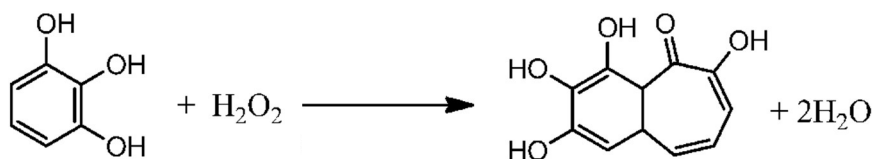
Квантификација активности G РОХ вршена је спектрофотометријском методом према Ја и сар. (2013). Реакциона смеша је садржала 100 mM фосфатни пуфер (pH 7), 15 mM гвајакол и 0.05% водоник-пероксид. Реакција је иницирана додавањем протеинског екстракта, а промена апсорбанце

услед настанка тетрагвајакола праћена је на таласној дужини $\lambda = 470 \text{ nm}$, током једног минута. Средње вредности промена апсорбанци су дељене са моларним екстинкцијским коефицијентом за тетрагвајакол ($\epsilon^{470} = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Мерења су вршена у три понављања.

Једна G POX јединица (U) представља количину ензима који разгради $1 \text{ }\mu\text{mol}$ водоник-пероксида у јединици времена по јединици биљног материјала у наведеним условима. Активност G POX је изражена или у односу на свежу масу биљног ткива ($\text{U mg}^{-1} \text{ SM}$) или у односу на концентрацију укупних солубилних протеина ($\text{U mg}^{-1} \text{ proteina}$).

7.5. Квантификација активности пирогалол пероксидазе

Редукција водоник-пероксида до воде посредством ензима пирогалол пероксидазе (P POX) врши се уз помоћ пирогалола као донора електрона. Пирогалол се у овој реакцији оксидује до пурпурагалина. Способност редукције водоник-пероксида од стране пирогалол пероксидазе и формирање пурпурагалина приказани су на Слици 17.



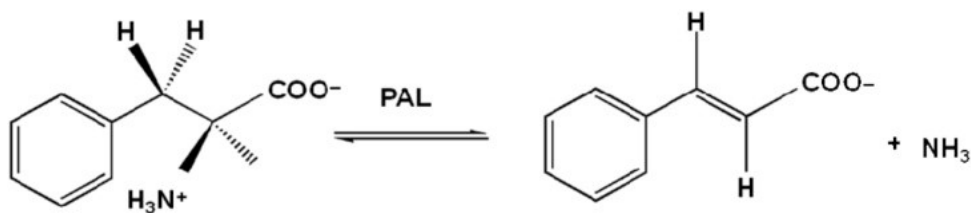
Слика 17. Редукција водоник-пероксида и оксидација пирогалола до пурпурагалина посредством пирогалол пероксидазе

Активност P POX и настајање пурпурагалина детектују се на таласној дужини $\lambda = 420 \text{ nm}$ и праћени су плаво-љубичастим бојењем реакционе смеше (Kukavica и сар., 2013). Реакциона смеша је садржала 0.1 mM фосфатни пуфер ($\text{pH } 7$), 20 mM пирогалол и 3.3 mM водоник-пероксид. Реакција је започета додавањем протеинског екстракта након чега је праћена промена апсорбанце током једног минута. Мерења су вршена у три понављања. Средња вредност апсорбанци дељена је са моларним екстинкцијским коефицијентом за пурпурагалин ($\epsilon^{470} = 12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Једна P POX јединица (U) представља количину ензима који разгради $1 \text{ }\mu\text{mol}$ водоник-пероксида у јединици времена по јединици биљног материјала у наведеним условима. Активност ензима P POX је изражена или у односу на свежу масу биљног ткива ($\text{U mg}^{-1} \text{ SM}$) или у односу на концентрацију укупних солубилних протеина ($\text{U mg}^{-1} \text{ proteina}$).

8. Екстракција и одређивање активности фенилаланин амонијум лиазае

Фенилаланин амонијум лиаза (PAL) катализује деаминацију аминокиселине фенилаланин у *trans*-циметну киселину при чему се ослобађа амонијум (Слика 18).



Слика 18. Деаминација аминокиселине фенилаланин посредством PAL ензима и настајање *trans*-циметне киселине уз ослобађање амонијума

Како би се одредила активност PAL коришћен је свеж биљни материјал. На леду су најпре одвојени корени и изданци, па су посебно хомогенизовани у претходно охлађеном 50 mM Tris-HCl пуферу (pH 8.8) уз додатак 10% поливинилпиролидона (PVP) и 0.1 mM EDTA (He и Gao, 2008). Хомогенизовано ткиво је профилирирано кроз Whatman No. 1 филтер папир, пребачено у хладне епендорф тубе, па центрифугирано 20 минута на 4 °C при брзини од 12 000 rpm. Центрифугирањем је издвојен доњи слој (талог од органела и ћелијских зидова) и супернатант са протеинима који је коришћен у даљем раду. Супернатант је одвојен у хладне епендорф тубе у чуван на – 80 °C до употребе.

Одређивање активности PAL вршено је спектрофотометријском методом уз праћење пораста апсорбанце услед формирања *trans*-циметне киселине на таласној дужини $\lambda = 290$ nm током једног минута. Реакциона смеша садржала је 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) и 20 mM L-фенилаланин, а реакција је иницирана додавањем протеинског екстракта. Смеша је инкубирана 30 минута на 30 °C, а реакција је заустављена додавањем 0.5 mL 10% трихлорсирћетне киселине (TCA).

Једна PAL јединица (U) представља количину ензима који формира 1 μ mol *trans*-циметне киселине из фенилаланина по минути, на 30 °C по јединици биљног материјала (Baque и сар., 2010). Мерење је вршено у три понављања. Активност PAL је изражена у односу на свежу масу биљног материјала (U mg⁻¹ SM).

9. Квантитативна анализа секундарних метаболита

9.1. Узорковање и припрема биљног материјала

Јувенилни биљни делови анализираних генотипова рода *Ocimum* узорковани су након 30 дана од *in vitro* засејавања. Узорковани биљни материјал је припремљен за процес сушења одвајањем изданака од корена. Биљни материјал је сушен на тамном и промајном месту, на собној температури и при влажности ваздуха од 55-60%. Након сушења, које је трајало 7 дана, суви биљни материјал је уситњен и спакован у папирне кесе до процеса екстракције.

Од биљног материјала припремљен је метанолни инфузум одмеравањем 100 mg сувог биљног материјала и додавањем 100 mL метанола. Смеша је, уз мешање, остављена 24 сата. Након 24 сата смеша је профильтрирана кроз Whatman No. 1 филтер папир и процес је поновљен са још 100 mL растварача. Након 48 сати поступак филтрирања је поновљен и филтрат је сједињен са филтратом добијеним претходним поступком.

Овако добијени инфузум је одмах након припреме коришћен за утврђивање количине укупних фенолних једињења, концентрације флавоноида, као и за мерење укупне антиоксидативне активности.

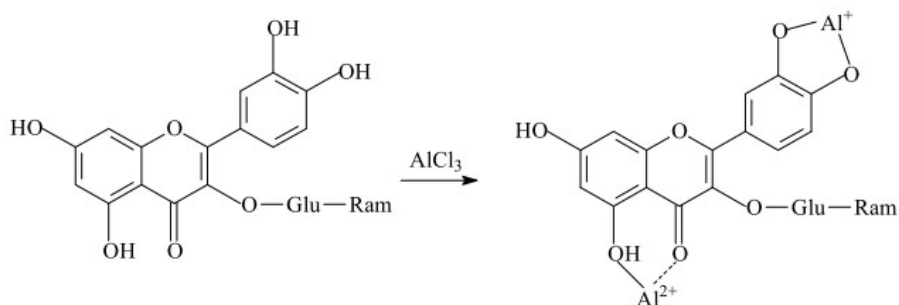
9.2. Одређивање количине укупних фенолних једињења

Количина укупних фенолних једињења одређивана је спектрофотометријском методом (Singleton и сар., 1999) уз коришћење Folin-Ciocalteu реагенса. Метода се заснива на одређивању редукујућег капацитета фенолних једињења који су растворени у инфузуму, при чему дисосовањем фенолних једињења настаје протон и феноксидни анјон који редукује Folin-Ciocalteu реагенс до јона који боји реакциону смешу у плаво.

Реакциона смеша је садржала метанолни инфузум, 10% Folin-Ciocalteu реагенс (растворен у води) и 7.5% NaHCO₃. Узорци су инкубирани 15 минута на температури од 45 °C након чега је одређивана апсорбанца на таласној дужини $\lambda = 765 \text{ nm}$. Мерење је вршено у три понављања. Исти поступак је извршен за стандардни раствор галне киселине при чему је конструисана калибрациона крива. Концентрација укупних фенолних једињења израчуната је на основу вредности апсорбанци за узорке и калибрационе криве за галну киселину, а изражена је као еквивалент галне киселине по милиграму сувог биљног материјала (GAE mg⁻¹ SM).

9.3. Одређивање количине флавоноида

Количина флавоноида је одређивана спектрофотометријском методом (Quettier-Deleu и сар., 2000) уз коришћење AlCl_3 . Ова метода се заснива на реакцији флавоноида и метала, при чему настају металокомплекси. Процес настанка металокомплекса у реакцији флавоноида и метала приказан је на Слици 19.



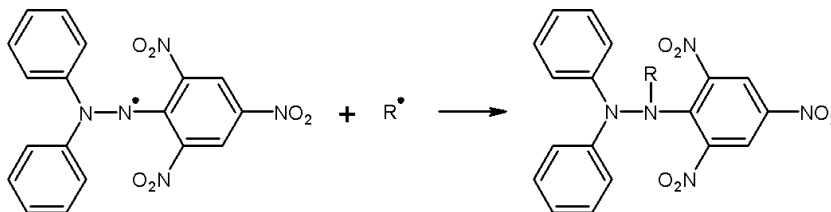
Слика 19. Настајање металокомплекса у реакцији флавоноида и метала

Реакциона смеша је садржала метанолни инфузум и 2% раствор AlCl_3 у метанолу. Контролни узорак је добијен мешањем метанола и 2% раствора AlCl_3 у метанолу. Узорци су инкубирани један сат на собној температури након чега је вршено читавање апсорбанци на таласној дужини $\lambda = 415 \text{ nm}$. Мерење је вршено у три понављања. Исти поступак је извршен за стандардни раствор рутина, при чему је конструисана калибрациона крива. Количина флавоноида израчуната је на основу вредности апсорбанци за узорке и калибрационе криве за рутин као стандард, а изражена је као еквивалент рутина по милиграму сувог биљног материјала ($\text{RUE mg}^{-1} \text{ SM}$).

10. Испитивање укупне антиоксидативне активности

Укупна антиоксидативна активност метанолних инфузума одређивана је спектрофотометријском методом која се заснива на мерењу степена неутрализације DPPH радикала (Такао и сар., 1994, са модификацијама према Kumarasamy и сар., 2007). DPPH радикал (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) је кристални љубичасти прах који у реакцији са антиоксидативним једињењима бива редукован до 1,1-дифенил-2-(2,4,6-тринитрофенил)-хидразина (Слика 20) при чему љубичаста боја стандардног раствора DPPH радикала прелази у жуту због формирања

нерадикалске форме. Интензитет губитка љубичасте боје пропорционалан је антиоксидативном капацитету метанолног инфузима.



Слика 20. Реакција преласка радикалске 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил форме у нерадикалску форму 1,1-дифенил-2-(2,4,6-тринитрофенил)-хидразина

Почетна реакциона смеша садржала је 1 mL метанолног инфузима и 1 mL раствора DPPH радикала ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$). За сваки узорак, почев од концентрације метанолног инфузима од 1 mg mL^{-1} припремљена је серија разблажења у концентрацијама од 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.99 и $0.97 \mu\text{g mL}^{-1}$. Припремљени узорци су инкубирани 30 минута на собној температури, након чега је спектрофотометријски одређивана апсорбанца на таласној дужини $\lambda = 517 \text{ nm}$. Средња вредност апсорбанци добијена је мерењем у три понављања. На основу разлика у апсорбанци узорака метанолних инфузима и контролних узорака (узорака без раствора метанолних инфузима) одређен је проценат инхибиције. На основу утврђених процената инхибиције при одређеној концентрацији, за сваки узорак и сваки инфузум, помоћу једначине линеарне регресије одређена је масена концентрација при којој је редуковано 50% радикала, односно утврђена је IC_{50} вредност.

11. Квалитативна анализа секундарних метаболита

Метанолни екстракти изданака и корена за потребе квалитативних анализа разблажени су смешом метанола и дестиловане воде у односу 1:1. Садржај рузмаринске и кофеинске киселине у узорцима одређен је LC-DAD-MS/MS методом помоћу *Agilent 1200 series* течног хроматографа куплованог са *Agilent series 6410A ESI-QqQ-MS/MS* (Agilent Technologies) контролисаног MassHunter ver. B.06.00. програмом, по модификованој методи Orčić и сар., (2014).

Ињектовано је $5 \mu\text{L}$ узорка. Раздвајање је извршено на Zorbax Eclipse XDB-C18 колони ($50 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$, Agilent Technologies) термостатираној на 50°C . Компоненте су елуиране мобилном фазом на бази 0.05% воденог раствора мравље киселине (A) и метанола (B), при протоку од 1.0 mL min^{-1} , у градијентном моду: 0 min 30% B, 6 min 70%, 9 min 100%, 12 min 100%, време рееквilibрације 3 min. За потребе евентуалне потврде идентитета праћен је UV/VIS сигнал у опсегу

од $\lambda = 190$ до $\lambda = 700$ nm. Елуат је без дељења тока прослеђен на ESI јонски извор чији су параметри били: притисак небулајзера 50 psi, температура и проток гаса за сушење (N₂) 350 °C и 10 L min⁻¹, напон на капилари 4000 V, негативни поларитет. Једињења су праћена динамиком у SRM (*eng. selected reactions monitoring*) моду, уз оптимизоване параметре дате у Табели 8.

Табела 8. Оптимизовани параметри SRM одређивања

једињење	M _w	t _R [min]	V _f	m/z прекурсора	m/z продукта	V _{col}
рузмаринска киселина	180	1.18	100	179	135	10
кофеинска киселина	360	2.53	120	359	161	14

Секвенцијалним разблажењем 1:1 припремљена је серија стандардних раствора у опсегу концентрација од 1.53 µg mL⁻¹ до 25.0 µg mL⁻¹. Концентрације анализата одређиване су методом екстерног стандарда, користећи калибрационе криве у ужем опсегу, прилагођеној концентрацији у узорку. За сва једињења коришћени су SRM сигнали. Хроматограми су обрађивани у MassHunter Workstation Qualitative Analysis софтверу, ver. B.06.00 (Agilent Technologies), док су калибрационе криве конструисане и концентрације очитаване у програму Microsoft Excel.

12. Статистичка обрада података

Сваки од појединачних експеримената је рађен у трипликату. Резултати добијени коришћењем SPSS софтверског пакета за статистичку обраду податка (SPSS for Windows, version 20, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), изражени су као средња вредност три понављања ± стандардна грешка, и представљени су табеларно и графички. Прикупљени подаци су анализирани путем ANOVA теста, са прагом значајности $p < 0.05$. За утврђивање постојања разлика између појединачних третмана коришћен је Tukey *post-hoc* тест са прагом значајности $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

I Ефекат пролонгираног соног стреса на физиолошке и биохемијске карактеристике клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у *in vitro* условима

1. Ефекат пролонгираног соног стреса на растење и развиће клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum*

Утврђивање обима деловања пролонгираног стреса изазваног различитим концентрацијама натријум хлорида (10, 20 и 30 mM) на продуктивност клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* током јувенилне фазе, у првих 28 дана растења и развића у култури *in vitro*, вршено је недељним мерењем свежје масе комплетних клијанаца, затим мерењем дужине изданака и дужине корена. Одабране концентрације натријум хлорида као стресног фактора представљале су оне концентрације за које се у прелиминарним истраживањима показало да представљају најниже концентрације соли у којима семена босиљка неометано клијају, при чему у самом процесу клијања не постоје значајне разлике у односу на контролни медијум, тј. медијум без натријум хлорида.

Резултати добијени мерењем свежје масе клијанаца приказани су у Табели 9.

Табела 9. Свежа маса (g) клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених у медијумима са различитим концентрацијама натријум хлорида током првог месеца у култури *in vitro*

	контрола	10 mM	20 mM	30 mM
7	23.1 ± 0.002	19.7 ± 0.01	20.87 ± 0.01	20.08 ± 0.01
14	56.12 ± 0.06	36.82 ± 0.03*	37.12 ± 0.03*	43.62 ± 0.63*
21	77.21 ± 0.05	45.66 ± 0.07*	64.16 ± 0.05	59.11 ± 0.37
28	125.56 ± 0.02	105.85 ± 0.02	118.78 ± 0.08	112.45 ± 0.12

Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± стандардна грешка. Звездица (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

За сваки од коришћених третмана добијене су ниже вредности свежје масе у поређењу са вредностима добијеним у контроли за исти временски период узорковања. У првој седмици развића најниже вредности за свежу масу су евидентирани у медијуму са 10 mM натријум хлоридом, при чему нису утврђене статистички значајне разлике између контроле и осталих третмана. И у другој недељи су најниже вредности измерене у истом медијуму, међутим, вредности за све три коришћене концентрације су статистички значајно ниже у односу на контролу. Током треће недеље *in vitro* развића *Ocimum basilicum* var. *minimum* статистички значајан инхибиторни ефекат остварио је натријум-хлорид у концентрацији од 10 mM, док 28. дана након клијања и поред нижих вредности измерених у свим третманима у поређењу са контролом, није утврђена статистички значајна разлика у свежој маси клијанаца.

Упоређивањем резултата добијених мерењима током четири недеље уочено је да се најзначајнији ефекат соног стреса на свежу масу клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* остварује у другој недељи *in vitro* растења и развића, уз постојање статистички значајних разлика у сваком од третмана у поређењу са контролом, као и током треће недеље, али при најнижој концентрацији стресора.

Резултати добијени мерењем дужине изданака клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* приказани су у Табели 10.

Добијене вредности указују на дозно-зависни ефекат натријум-хлорида, при чему је негативни утицај на издуживање надземних органа статистички најзначајнији при највишим концентрацијама соли. Такође, 28. дана у свим третманима утврђена је статистички значајна разлика у дужини изданака у поређењу са контролом.

Табела 10. Дужина изданака (mm) клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених у медијумима са различитим концентрацијама натријум хлорида током 28 дана у култури *in vitro*

	контрола	10 mM	20 mM	30 mM
7	20.52 ± 0.73	16.78 ± 0.57	15.85 ± 0.63	12.01 ± 0.54
14	30.46 ± 1.71	27.55 ± 1.91	23.09 ± 1.96	18.45 ± 1.44*
21	32.08 ± 1.46	27.64 ± 1.69*	28.64 ± 1.87	22.03 ± 2.23*
28	44.39 ± 2.11	30.85 ± 4.00*	34.39 ± 2.32*	29.91 ± 1.24*

Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± стандардна грешка. Звездича (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Резултати добијени мерењем дужине корена клијанаца приказани су у Табели 11.

Утврђено је да је на издуживање корена негативан ефекат соли остварен тек 28. дана, док је у осталим третманима стимулисано издуживање корена у поређењу са контролом, при чему су највише вредности добијене за умерене дозе натријум-хлорида.

Табела 11. Дужина корена (mm) клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених на медијумима са различитим концентрацијама натријум хлорида током првог месеца у култури *in vitro*

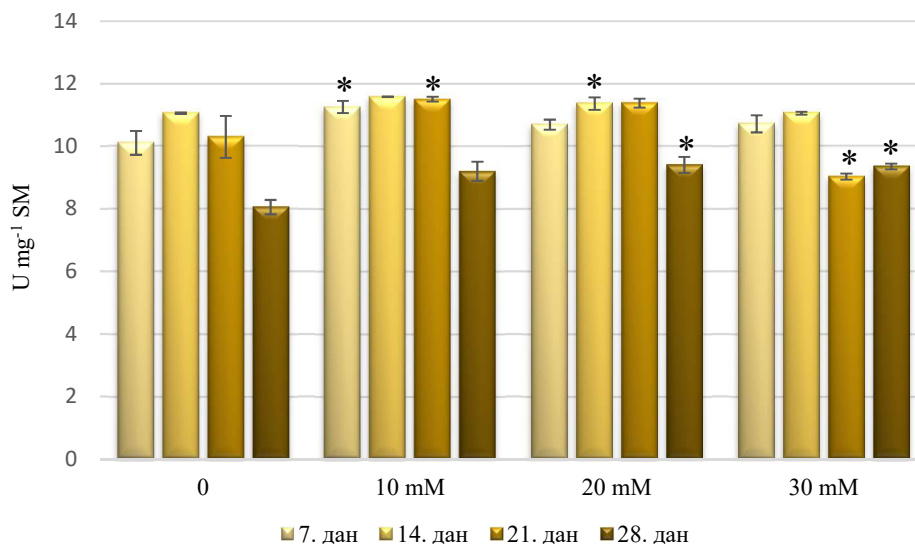
	контрола	10 mM	20 mM	30 mM
7	28.83 ± 1.96	31.19 ± 3.23	36.79 ± 2.59*	33.49 ± 1.88*
14	40.10 ± 0.53	42.14 ± 5.19	42.37 ± 5.61	43.99 ± 5.27
21	42.21 ± 3.63	50.45 ± 5.94*	51.42 ± 2.35*	47.48 ± 3.81*
28	60.28 ± 3.55	51.68 ± 1.29*	58.17 ± 2.07	55.16 ± 3.37*

Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± стандардна грешка. Звездича (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

2. Физиолошки одговор клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* на сони стрес

Физиолошки одговор на стрес изазван солима утврђиван је мерењем активности антиоксидативних ензима у изданцима и коренима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* током четири недеље растења и развића у *in vitro* условима.

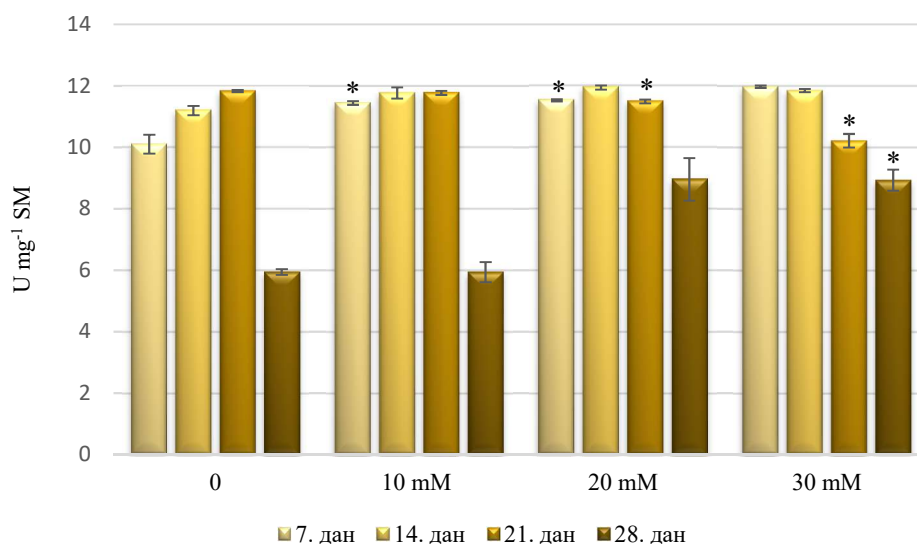
У изданцима клијанаца гајених на медијумима са различитим концентрацијама натријум хлорида уочена је статистички значајна разлика у активности супероксид дисмутазе током прве четири недеље растења и развића у *in vitro* условима (Графикон 1). У првим данима развића изданака детектована је повећана активност супероксид дисмутазе у односу на контролу и разлика у активности је статистички значајна при најнижој концентрацији натријум хлорида. Максимална активност ензима забележена је 14. и 21. дана, како у контроли, тако и у третманима са 10 и 20 mM натријум хлорида и вредности су више у односу на контролу. Након повећања активности супероксид дисмутазе током 14. и 21. дана, статистички значајан пад у активности овог ензима у изданцима *Ocimum basilicum* var. *minimum* забележен је 21. и 28. дана при највишој концентрацији натријум хлорида (30 mM), при чему су вредности измерене 21. дана при концентрацији од 30 mM ниже од вредности које су добијене истог дана за контролну групу изданака.



Графикон 1. Активност супероксид дисмутазе у изданцима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури *in vitro*. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Звездица (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Другачији тренд у активности супероксид дисмутаза може се уочити у подземним органима *Ocimum basilicum* var. *minimum*, како у односу на временски период узорковања, тако и у односу на концентрацију самог стресора у медијуму. Резултати мерења активности супероксид дисмутаза у подземним органима клијанаца приказани су на Графикону 2.

Као и у случају изданака, евидентиран је пораст у активности супероксид дисмутаза у првим данима растења и развића корена у поређењу са контролом, при чему је пораст активности овог ензима статистички значајан у концентracијама натријум хлорида од 10 и 20 mM. Међутим, при овим концентрацијама натријум хлорида, супероксид дисмутаза показује виши ниво активности у корену у поређењу са изданком.



Графикон 2. Активност супероксид дисмутаза у корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури *in vitro*.

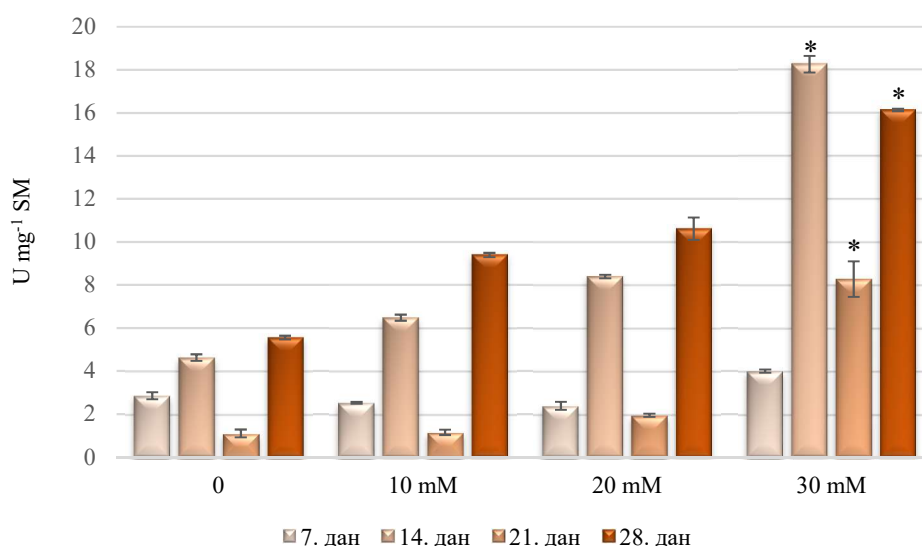
Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Звезда (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Временски пораст у активности супероксид дисмутаза није константан и не прати развиће клијанаца пошто је 28. дана у подземним органима клијанаца забележен драстичан пад у активности овог ензима, како у контроли тако и медијумима са 10, 20 и 30 mM натријум хлорида.

При највишој концентрацији натријум хлорида (30 mM) уочава се статистички значајно виша активност супероксид дисмутаза током 28. дана у односу на контролу, при чему су ова вредност, као и вредност измерена 21. дана, ниже од оних које су добијене током 7. и 14. дана при истој концентрацији натријум хлорида.

Резултати мерења активности каталазе у клијанцима *Ocimum basilicum* var. *minimum* показали су да је активност овог ензима индукована стресом, као и да су степен и образац активности различити у зависности од испитиваног ткива. Резултати мерења активности каталазе у надземним органима клијанаца приказани су на Графикону 3.

Добијени резултати указују на то да је у изданцима присутна дозно-зависна активност каталазе, при чему је са порастом концентрације натријум-хлорида забележен и пораст у активности овог ензима. Статистички значајно виши ниво активности каталазе забележен је при највећој концентрацији натријум хлорида (30 mM).

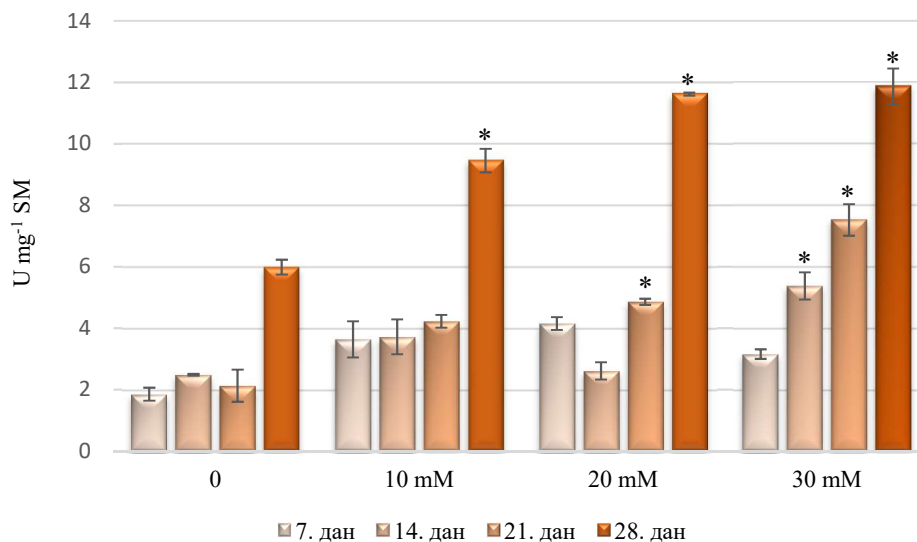


Графикон 3. Активност каталазе у изданцима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури *in vitro*. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Звезда (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Временски посматрано, активност каталазе није пратила у потпуности растење и развиће изданака. Четрнаестог дана евидентиран је пораст у ензимској активности у односу на мерења извршена седмог дана. Уједно је ензим и најактивнији четрнаестог дана при највећој концентрацији натријум хлорида (30 mM). Међутим, током треће недеље пролонгираног соног стреса евидентиран је пад у активности каталазе у сваком од коришћених медијума (укључујући и контролу) при чему су вредности биле троструко ниже у односу на вредности добијене 14. дана. Овај пад у активности каталазе 21. дана растења и развића праћен је поновним повећањем активности током 28. дана *in vitro* културе.

Резултати мерења активности каталазе у подземним органима клијанаца приказани су на Графикону 4.

Измерена активност каталазе у корену *Ocimum basilicum* var. *minimum*, слично активности у изданцима, била је дозно-зависна, при чему је уочен пораст у активности овог ензима при концентрацијама натријум хлорида од 10, 20 и 30 mM у односу на контролу. Највиша активност каталазе измерена је у медијуму са највећом концентрацијом натријум-хлорида (30 mM) и праћена је вредношћу измереној при умереној концентрацији овог стресора (20 mM). Додатно, ниво активности каталазе у подземним органима клијанаца нижа је у односу на вредности добијене за активност овог ензима у надземним органима клијанаца при истим концентрацијама натријум хлорида.

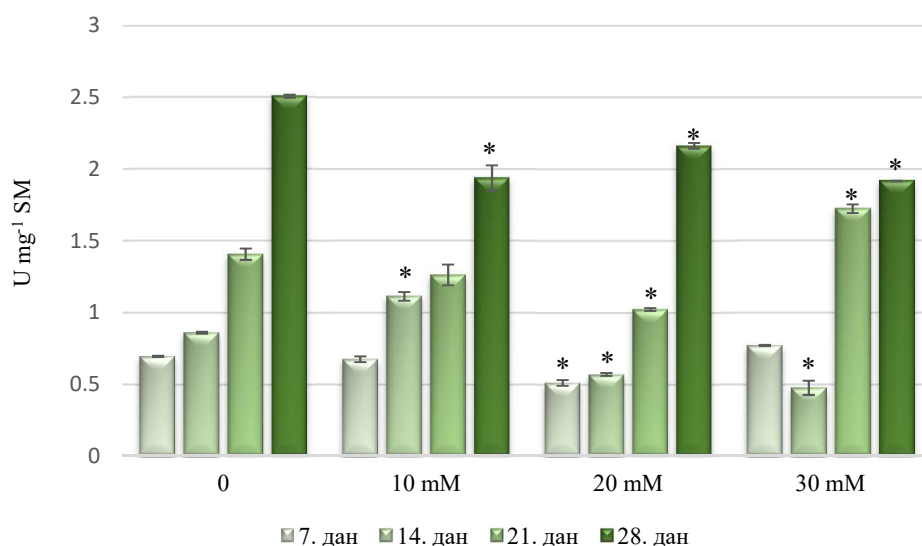


Графикон 4. Активност каталазе у корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури *in vitro*. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Звезда (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Током прве четири недеље растења и развића корена у *in vitro* култури, посматрано у временском оквиру, уочен је пораст у активности каталазе, при чему је, у односу на контролу, при концентрацији од 10 mM натријум хлорида активност статистички значајно повишена 28. дана, у концентрацији од 20 mM ензим је активнији 21. и 28. дана, док је при највећој концентрацији соли активност каталазе статистички значајно повишена 14., 21. и 28. дана у односу на вредности измерене у контроли током истог временског периода.

Активност ензима пирогалол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* показала је дозну и временску зависност у односу на стрес изазван различитим концентрацијама натријум хлорида. Резултати мерења активности пирогалол пероксидазе у надземним деловима клијанаца приказани су на Графикону 5.

Посматрано у односу на примењену концентрацију натријум хлорида, генерално се може уочити пад у активности пирогалол пероксидазе у изданцима, јер су измерене вредности ниже у поређењу са вредностима у контроли. Статистички значајно виши ниво активности пирогалол пероксидазе забележен је у медијуму са 10 mM натријум хлоридом 14. дана, али и 21. дана у медијуму са 30 mM натријум хлоридом. У медијуму са 20 mM све измерене вредности су статистички значајно ниже у односу на контролу, док су у највишој концентрацији од 30 mM натријум хлорида вредности статистички значајно ниже 14. и 28. дана.

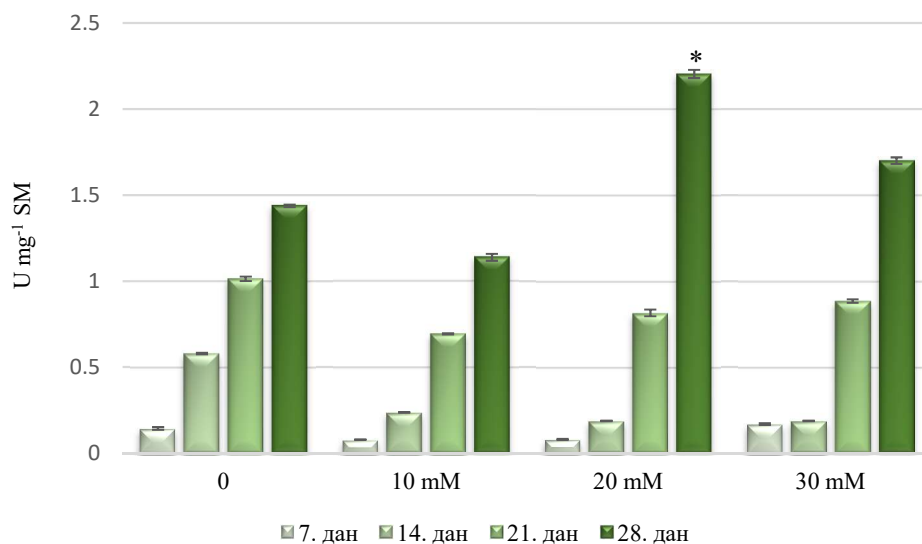


Графикон 5. Активност пирогалол пероксидазе у изданцима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури *in vitro*. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Звездича (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Без обзира на ниво активности у односу на примењену концентрацију стресора, како у контроли, тако и у медијумима са различитим концентрацијама натријум хлорида, уочен је пораст у активности овог ензима у надземним деловима клијанаца током четири недеље њиховог гајења у култури *in vitro*.

Као и у надземним органима клијанаца и у подземним органима је уочена дозна и временска зависност у активности пирогалол пероксидазе током 28 дана *in vitro* растења и развића. Резултати мерења активности пирогалол пероксидазе у подземним органима клијанаца приказани су на Графикону 6.

Развиће клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* праћено је порастом у активности пирогалол пероксидазе, па је и поред ниске активности овог ензима током прве недеље забележен даљи пораст у активности овог ензима током 28 дана. При поређењу са контролом уочено је да вредности варирају у зависности од концентрације натријум хлорида у медијуму.

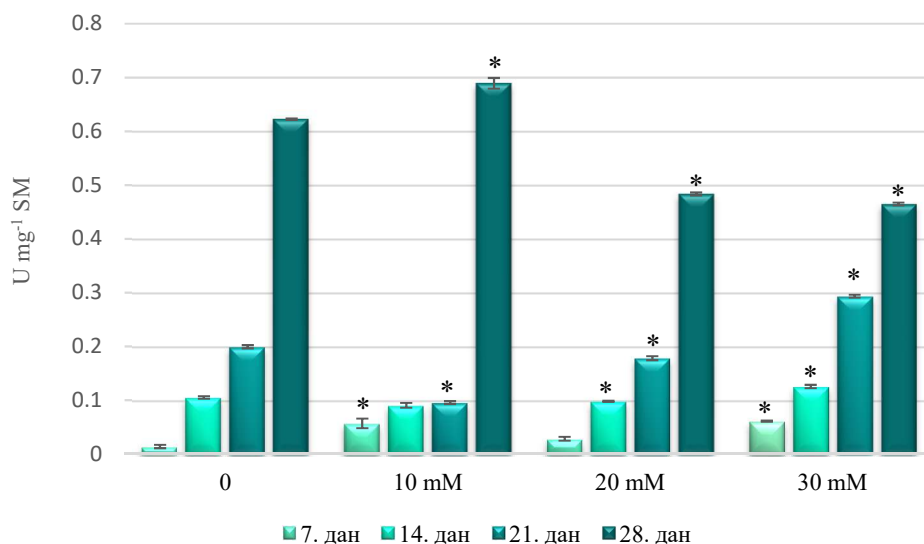


Графикон 6. Активност пирогалол пероксидазе у корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури *in vitro*. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Звезда (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Ниска концентрација натријум-хлорида инхибирала је наведени ензим, па су у овом медијуму евидентиране ниже вредности пирогалол пероксидазе за сва четири мерења у поређењу са контролом. Међутим, ове разлике у активности нису статистички значајне. У медијуму са 20 mM натријум хлоридом, поред нижих активности прве три недеље (без статистичке значајности), 28. дана је измерена неколико пута виша активност ензима у поређењу са контролом. Ово је уједно и једини третман у коме је активност пирогалол пероксидазе статистички значајно различита у односу на контролу. Додатно, измерена вредност је виша у односу на максималне вредности пирогалол пероксидазе у издацима стресираних клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum*.

Резултати добијени мерењем активности гвајакол пероксидазе у надземним органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* приказани су на Графикону 7.

У изданцима *Ocimum basilicum* var. *minimum* са растењем и развићем клијанаца дошло је и до пораста у активности овог ензима, при чему је 28. дана измерена 4-5 пута виша активност гвајакол пероксидазе у односу на претходне временске периоде мерења, како у контроли, тако и у осталим третманима.

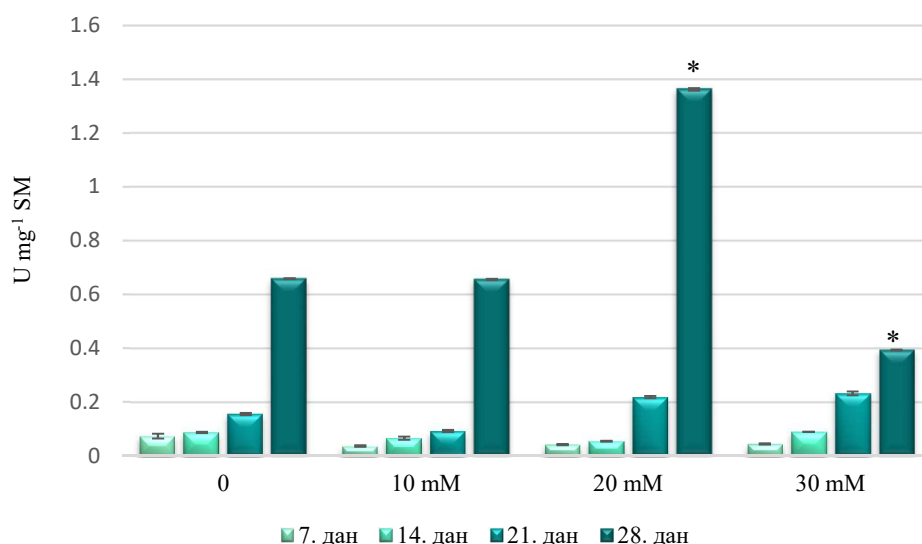


Графикон 7. Активност гвајакол пероксидазе у изданцима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури *in vitro*. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Звезда (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

У медијуму са 10 mM натријум хлоридом разлике у активности гвајакол пероксидазе су статистички значајне у односу на контролу у свим узорцима изузев 14. дана. За разлику од овог медијума, у медијуму са 20 mM натријум хлоридом само 7. дана није утврђена статистички значајна разлика, док су се вредности измерене 14., 21. и 28. дана статистички значајно разликовале у поређењу са контролом. У медијуму са највишом концентрацијом натријум хлорида (30 mM) резултати сваког од третмана показали су статистички значајне разлике у активности гвајакол пероксидазе у поређењу са контролом. Испитивани ензим је био најактивнији 28. дана при ниској концентрацији натријум хлорида (10 mM), уз статистички значајне разлике у поређењу са контролом.

Временска и дозно-зависна активност гвајакол пероксидазе може се уочити и код подземних органа клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених у условима стреса изазваног солима. Резултати мерења активности гвајакол пероксидазе у подземним органима клијанаца приказани су на Графикону 8.

У сваком од примењених третмана, укључујући и контролу, евидентиран је пораст у активности коренске гвајакол пероксидазе током четири недеље растења и развића у *in vitro* култури, при чему су вредности измерене 28. дана биле значајно веће у поређењу са осталим третманима. Истовремено, највише измерене вредности за коренске гвајакол-пероксидазе биле су више у односу на вредности овог ензима које су измерене у изданцима.



Графикон 8. Активност гвајакол пероксидазе у корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених на медијумима са различитом концентрацијом натријум хлорида током првог месеца у култури *in vitro*.

Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Звезда (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Посматрано у различитом временском периоду, у медијуму са 10 mM натријум хлоридом измерене су незнатно ниже вредности гвајакол пероксидазе у односу на контролу за сва четири мерења, међутим, нису утврђене статистички значајне разлике између ових резултата. У случају медијума са 20 mM натријум хлоридом, 28. дана статистички значајно расте активност овог ензима, док у претходним мерењима нису утврђене статистички значајне разлике у активности у односу на контролу. Такође, у медијуму са 30 mM натријум хлоридом, 28. дана разлика у активности је статистички значајна, али при највишој концентрацији соли активност гвајакол пероксидазе била је знатно нижа у поређењу са контролом.

II Физиолошки одговор клијанаца различитих генотипова босилјка на пролонгирани нутритивни стрес

1. *Ocimum basilicum* var. *minimum*

1.1. Карактеристике клијања

Ефекти различитог режима исхране са KNO_3 као главним извором азота, или комбинацијом KNO_3 и NH_4NO_3 на карактеристике клијања генотипа *Ocimum basilicum* var. *minimum* испитивани су мерењем средњег времена клијања (MTG), брзине клијања (RG), укупног процента клијања (GP), као и униформности клијања (U). Резултати мерења приказани су у Табели 12.

Највећи проценат клијања ($\text{GP} = 84.78\%$) забележен је при третману са највећом концентрацијом нутријената и нитратима као главним извором азота и нижа концентрација нутријената није узроковала статистички значајне разлике у укупном клијању. Клијање је значајно угрожено када су семена клијала у третману са високом концентрацијом нутријената уз присуство амонијума ($\text{GP} = 70.53\%$). Већа концентрација нутријената убрзава процес клијања и утврђено је да семена клијају у најкраћем временском року при високим концентрацијама нутријената без амонијума ($\text{MTG} = 2.95$). Доступност нутријената није значајно утицала на брзину клијања семена *Ocimum basilicum* var. *minimum*. Значајне разлике постоје између третмана са нитратима и амонијумом, при чему је брзина клијања нижа у присуству амонијумових јона ($\text{RG} = 39.95$).

Табела 12. Карактеристике клијања семена генотипа *Ocimum basilicum* var. *minimum* при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота

	GP	MTG	RG	U
1a	83.52 ± 0.59a	4.28 ± 0.35a	58.69 ± 0.83a	19.51 ± 0.12a
2a	83.72 ± 0.46a	3.78 ± 0.09ab	58.17 ± 1.81a	22.15 ± 0.09a
3a	84.78 ± 0.64a	2.95 ± 0.08b	57.59 ± 1.79a	28.74 ± 0.15b
1b	74.72 ± 0.63c	4.63 ± 0.89a	39.59 ± 0.97b	16.14 ± 0.14a
2b	72.22 ± 0.97bc	4.67 ± 0.41a	45.43 ± 1.11b	15.46 ± 0.07a
3b	70.53 ± 1.03b	3.94 ± 0.17ab	47.81 ± 0.75b	17.90 ± 0.05a

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

Резултати добијени за униформно клијање семена указују да амонијумове соли имају негативни ефекат на процес клијања; семена су униформније клијала у третманима са KNO_3 као главним извором азота и високом концентрацијом нутријената ($U = 28.74$).

1.2. Концентрација фотосинтетичких пигмената

Резултати добијени мерењем концентрације фотосинтетичких пигмената као показатеља стања процеса фотосинтезе у условима различитог снабдевања нутријентима током 28 дана *in vitro* растења и развића указали су на значајан ефекат како концентрације, тако и типа нутријената на примарне процесе клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum*. Резултати су приказани у Табели 13.

Добијене вредности за концентрацију хлорофила *a* су у опсегу од 0.265 до 1.135 mg g^{-1} SM, а највећа концентрација измерена је при третману 3а и значајно се разликује од осталих вредности. Концентрација хлорофила *b* је у опсегу вредности од 0.135 до 0.517 mg g^{-1} SM. Највећа концентрација је измерена при третману 3а и статистички се значајно разликује од осталих вредности. Однос фотосинтетичких пигмената је статистички значајно различит при третману 3b.

Концентрација каротеноида значајно варира у односу на тип коришћеног третмана. Резултати добијени мерењем концентрације каротеноида приказани су у Табели 13. Измерене вредности су у опсегу од 0.037 до 0.125 mg g^{-1} SM. Највећа концентрација каротеноида измерена је при 3b третману и праћена је концентрацијом измереном при третману 3а, при чему није утврђена статистички значајна разлика између ова два третмана.

Табела 13. Концентрација хлорофила *a*, хлорофила *b*, однос хлорофила *a/b* и концентрација каротеноида (mg g^{-1} SM) у свежим листовима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота

	хлорофил <i>a</i>	хлорофил <i>b</i>	хлорофил <i>a/b</i>	каротеноиди
1a	0.369 ± 0.001a	0.179 ± 0.002a	2.05 ± 0.01a	0.055 ± 0.001a
2a	0.385 ± 0.003ab	0.188 ± 0.007a	2.05 ± 0.09a	0.0502 ± 0.001a
3a	1.135 ± 0.001c	0.517 ± 0.003b	2.195 ± 0.015a	0.120 ± 0.001b
1b	0.265 ± 0.015d	0.135 ± 0.005a	1.97 ± 0.445a	0.041 ± 0.002a
2b	0.311 ± 0.013e	0.141 ± 0.017a	2.23 ± 0.175a	0.037 ± 0.01a
3b	0.627 ± 0.02f	0.148 ± 0.042a	4.65 ± 0.18b	0.125 ± 0.01b

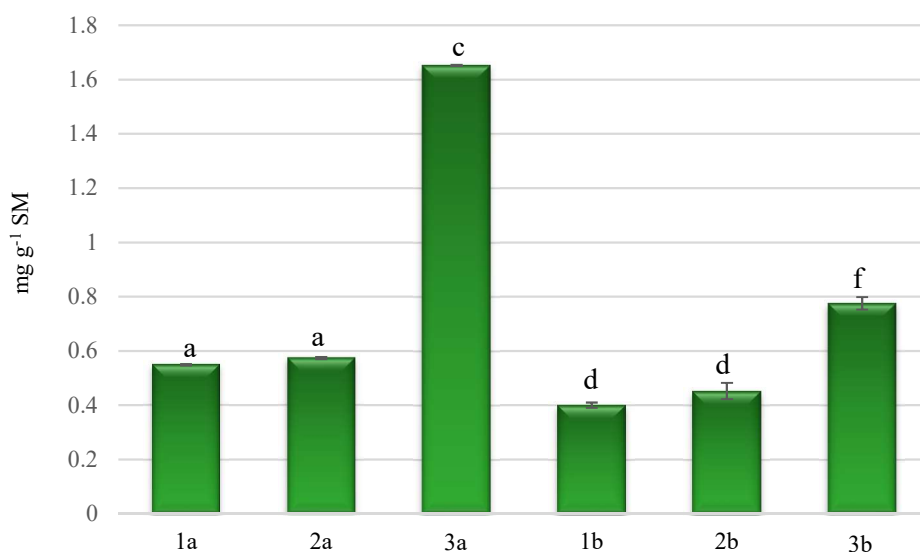
Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

Ниска концентрација минералних елемената довела је до вишеструког пада у концентрацији каротеноида, јер је у свим осталим третманима (1a, 2a, 1b и 2b) концентрација каротеноида 2-3 пута нижа у поређењу са 3a и 3b третманима.

Нутритивна депривација (1a, 2a, 1b и 2b третмани), али и висока концентрација нутријената са 20.6 mM NH_4NO_3 (третман 3b) резултирали су падом у концентрацији појединачних фотосинтетичких пигмената, али и у укупној количини пигмената. Вредности за количину укупног хлорофила представљени су на Графикону 9.

Анализирањем интензитета фотосинтетичког процеса посредством вредности добијених за количину укупног хлорофила може се увидети да најповољнији састав медијума за растење и развиће *Ocimum basilicum* var. *minimum* укључује високу концентрацију минералних елемената са 24.7 mM KNO_3 као извором азота, без присуства амонијумових јона.

Укључујући и податке добијене за концентрацију хлорофила *a*, концентрацију хлорофила *b*, као и посматрањем односа ова два фотосинтетичка пигмента, уочено је да висока концентрација нутријената са 24.7 mM KNO_3 као главним извором азота (третман 3a) значајно и вишеструко превазилази све друге третмане са неколико пута вишим вредностима. Додатно је и статистички утврђена разлика како у типу, тако и у концентрацији минералних елемената, јер су се резултати и статистички значајно разликовали при поређењу концентрације нутријената и форме доступног азота.



Графикон 9. Количина укупног хлорофила у свезим листовима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка.

Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

1.3. Концентрација укупних солубилних протеина

Резултати добијени мерењем концентрације укупних солубилних протеина клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* приказани су у Табели 14.

У изданцима наведеног генотипа измерена концентрација протеина је у опсегу вредности од 1.56 до 7.51 mg g⁻¹ SM. Највећа концентрација је измерена при третману 3a, статистички се значајно разликује од осталих третмана и вишеструко превазилази остале вредности добијене мерењем концентрације протеина у изданцима. Додатно, знатно ниже вредности измерене су при амонијачној исхрани у поређењу са нитратним третманима. Растење и развиће у третманима са различитом концентрацијом минералних елемената и комбинованом азотном исхраном није довело до значајних разлика у концентрацији протеина у надземним органима *Ocimum basilicum* var. *minimum*.

Измерена концентрација укупних солубилних протеина у подземним органима је у опсегу вредности од 11.18 до 18.37 mg g⁻¹ SM. Највећа концентрација протеина измерена је у коренима гајеним при третману 3a, а најмања при третману 1b. У екстрактима корена нису утврђене статистички значајне разлике у синтези протеина у зависности од концентрације минералних елемената, али су разлике статистички значајне када су у питању различите форме доступног азота. За третмане који су укључивали KNO₃ и NH₄NO₃ утврђена је статистички значајно нижа концентрација протеина у односу на третмане без NH₄NO₃. Додатно, утврђено је постојање значајне разлике у количини протеина који се синтетишу у надземним у односу на подземне органе *Ocimum basilicum* var. *minimum*, а синтеза ових градивних јединица је вишеструко интензивирана у корену.

Табела 14. Концентрација укупних солубилних протеина (mg g⁻¹ SM) у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у зависности од количине и типа нутријената

	изданак	корен
1a	3.03 ± 0.05a	16.12 ± 0.83a
2a	4.53 ± 0.02a	17.46 ± 1.81a
3a	7.51 ± 0.07c	18.37 ± 1.79a
1b	1.87 ± 0.18b	11.18 ± 0.97b
2b	2.51 ± 0.14b	13.88 ± 1.11b
3b	1.56 ± 0.07b	14.14 ± 0.75b

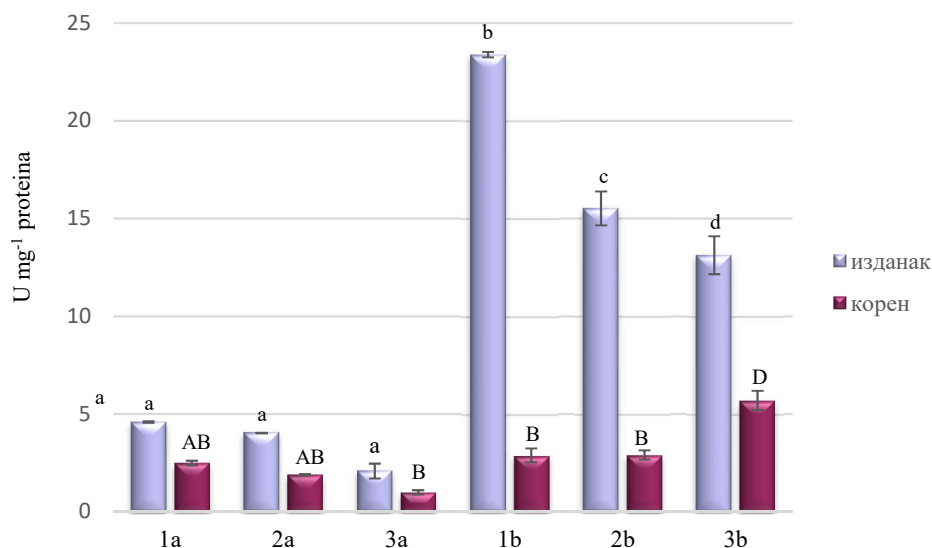
Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике (p < 0.05) између третмана на основу Tukey теста

1.4. Активност ензимских компоненти одбрамбеног система

1.4.1. Активност супероксид дисмутазе

Способност неутрализације супероксид-анјон радикала мерена кроз активност супероксид дисмутазе у изданцима и коренима клијанаца указује на значајне разлике у активности овог антиоксидативног ензима у различитим органима *Ocimum basilicum* var. *minimum*. Додатно, разлике су статистички значајне и у односу на тип минералне исхране. Резултати мерења приказани су на Графикону 10.

У условима у којима је KNO_3 коришћен као главни извор азота (третмани „а“), нутритивна депривација (третмани 1а и 2а) довела је до благог пораста у активности супероксид дисмутазе у изданцима, али овај пораст активности није статистички значајан. Исти тренд у наведеним третманима уочен је и у корену. Међутим, иако је наведени тренд пораста активности супероксид дисмутазе утврђен и код изданака гајених у третманима са комбинованом азотном исхраном, евидентирана је вишеструко увећана активност супероксид дисмутазе у присуству NH_4NO_3 , при чему су максималне вредности измерене у нутритивно депривираним изданцима са 1b третмана (третман са 4.7 mM KNO_3 и 5.15 mM NH_4NO_3). Супротан тренд приметан је у коренима при истим третманима.

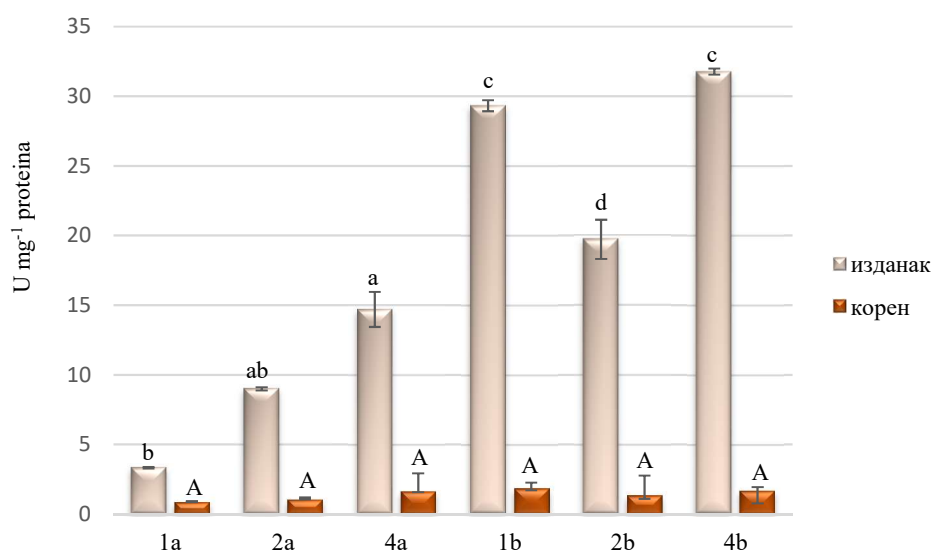


Графикон 10. Активност супероксид дисмутазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између корена на основу Tukey теста

1.4.2. Активност каталазе

Резултати добијени мерењем активности каталазе у клијанцима *Ocimum basilicum* var. *minimum* приказани су на Графикону 11.

Анализирањем резултата добијених за каталазну активност уочено је да овај ензим у корену *Ocimum basilicum* var. *minimum* не показује ни дозну специфичност, а ни нутритивну зависност, пошто није констатована статистички значајна индукованост активности ни у једном од коришћених третмана. Измерена активност у сваком од третмана била је нижа од 2 U mg^{-1} протеина, па се може закључити да коренски каталазни систем антиоксидативне заштите није у корелацији са компонентама минералне исхране. Са друге стране, у изданцима је каталаза индукована и ниво активности је у вези и са количином доступних нутријената, имајући у виду да је при третманима 1a, 2a и 3a забележен пораст у активности каталазе са порастом концентрације минералних елемената. Осим што је у вези са концентрацијом минералних елемената, каталазна активност у изданцима *Ocimum basilicum* var. *minimum* у вези је и са формом азотне исхране. Утврђено је да се при третманима у којима су присутни амонијумови јони активност каталазе значајно повећава у односу на третмане са исхраном базираном на нитритима. Међутим, у екстрактима добијеним из изданака при третманима 1b и 3b није утврђена статистички значајна разлика у каталазној активности.

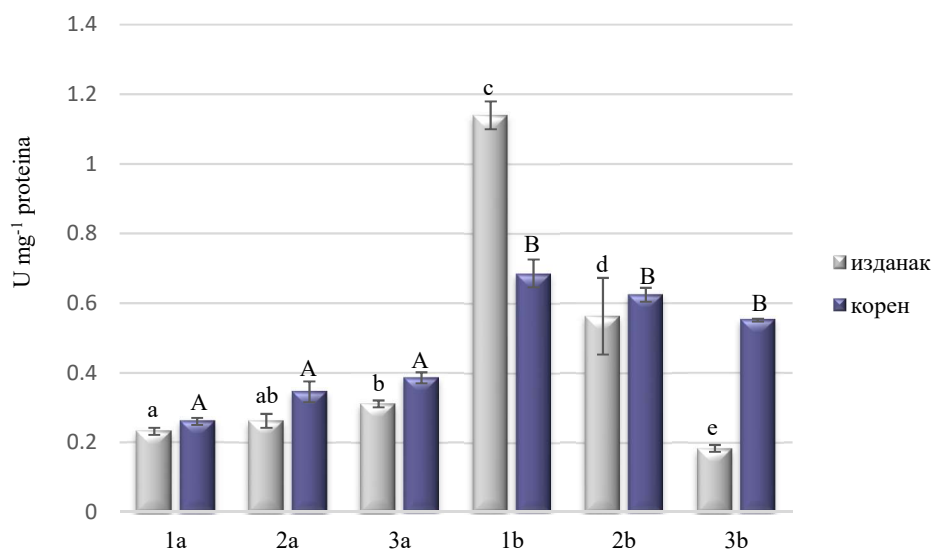


Графикон 11. Активност каталазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између корена на основу Tukey теста

1.4.3. Активност аскорбат пероксидазе

Резултати добијени мерењем активности аскорбат пероксидазе у деловима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* приказани су на Графикону 12.

Резултати указују да се статистички значајна разлика најпре може уочити у односу на форму азотне исхране. Услед присуства амонијумових јона активност аскорбат пероксидазе се повећава, при чему је у овим третманима евидентирана негативна корелација у активности овог ензима у зависности од количине доступних нутријента. Исти тренд је забележен и у изданцима и у корену, при чему је овај ензим најактивнији у нутритивно депривираним изданцима гајеним у присуству амонијумових јона (1b третман), а најнижа активност је при 3b третману. Уједно, приликом примене комбиноване азотне исхране током *in vitro* развића овог генотипа, при третманима 2b и 3b више вредности су измерене у корену. Супротни тренд је забележен при третманима базираним на нитратној исхрани; са повећавањем концентрације минералних елемената повећава се активност аскорбат пероксидазе. Овај ензим је показао виши ниво активности у корену у односу на изданке, али нису утврђене статистички значајне разлике у активности коренских аскорбат пероксидаза у односу на концентрације минералних елемената. У изданцима је утврђена статистички значајна разлика у активности овог ензима при 1a третману у поређењу са 3a третманом.

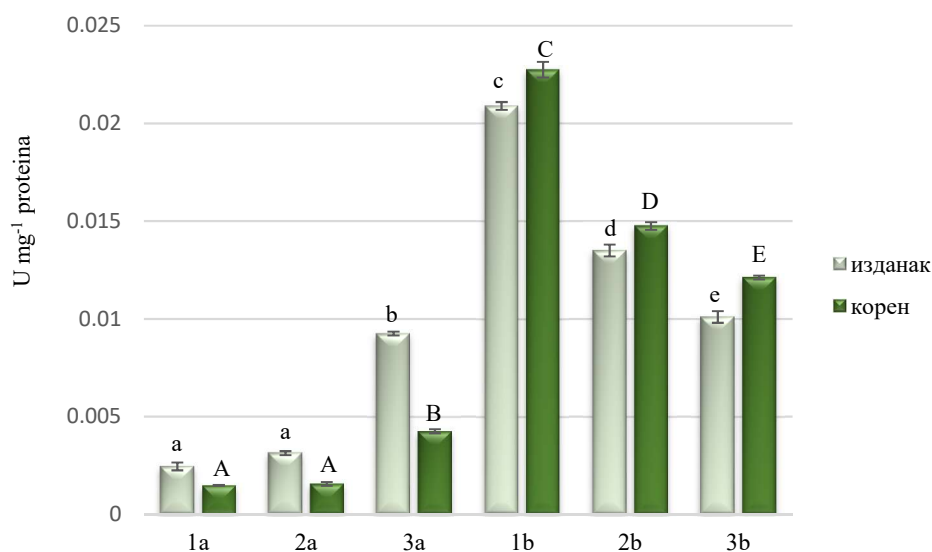


Графикон 12. Активност аскорбат пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у зависности од количине и типа нутријента. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између корена на основу Tukey теста.

1.4.4. Активност гвајакол пероксидазе

Резултати добијени мерењем активности гвајакол пероксидазе у различитим органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* приказани су на Графикону 13. Значајне разлике у активности наведеног ензима уочене су и у односу на концентрацију нутријената и у односу на форму азота.

У третманима са нитратном формом азотне исхране (третмани „а“) уочено је да је активност гвајакол пероксидазе значајно увећана при третману 3а (24.7 mM KNO₃) у поређењу са 2а и 1а третманима. Ова разлика у активности је и статистички значајна. Исти тренд у активности наведеног ензима је забележен и у корену, при чему су измерене вредности ниже у односу на изданке. Знатно виша активност ензима гвајакол пероксидазе је евидентирана при комбинованој азотној исхрани, тј. у медијумима са NH₄NO₃ (третмани „б“), како у изданцима, тако и у корену. Присуство амонијумових јона и нутритивна депривација индуковале су активност гвајакол пероксидазе, па је са повећањем концентрације минералних елемената забележен пад у активности овог ензима. Међутим, за разлику од третмана базираних на нитратној форми азота где је гвајакол пероксидаза активнија у изданцима, при третманима 1b, 2b и 3b гвајакол пероксидаза је активнија у корену.



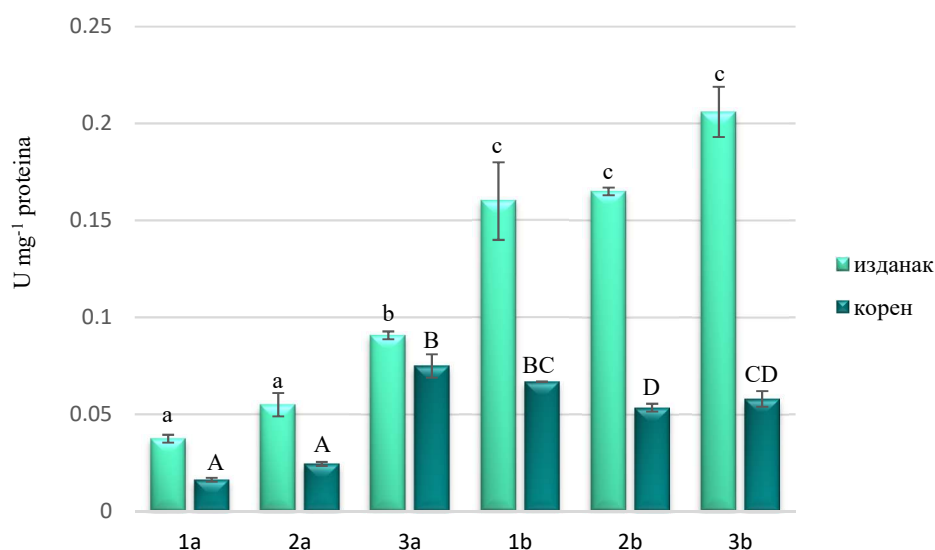
Графикон 13. Активност гвајакол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између корена на основу Tukey теста

1.4.5. Активност пирогалол пероксидазе

Резултати добијени мерењем активности пирогалол пероксидазе у деловима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* приказани су на Графикону 14. Третмани са различитом концентрацијом и различитим типом нутријената довели су до промена у активности пирогалол пероксидазе, али остварени ефекти су различити и у зависности од испитиваних биљних органа.

При сваком од примењених третмана активност пирогалол пероксидазе расте са порастом концентрације нутријената. Међутим, резултати су показали да подлога са амонијумовим јонима значајно индукује активност овог пирогалол пероксидазе. У екстрактима добијеним из надземних органа клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајеног на третманима са комбинованом азотном исхраном („b“ третмани) измерена је неколико пута већу активност пирогалол пероксидазе у односу на изданке гајане на третманима са KNO_3 као главним извором азота и истом концентрацијом минералних елемената.

Супротно изданима, у корену су са повећавањем концентрације минералних елемената измерене ниже активности пирогалол пероксидазе (третмани 2b и 3b). Статистички значајно снижена активност коренске пирогалол пероксидазе забележена је при третманима 1a и 2a, како у односу на 3a третман, тако и на све третмане са NH_4NO_3 .

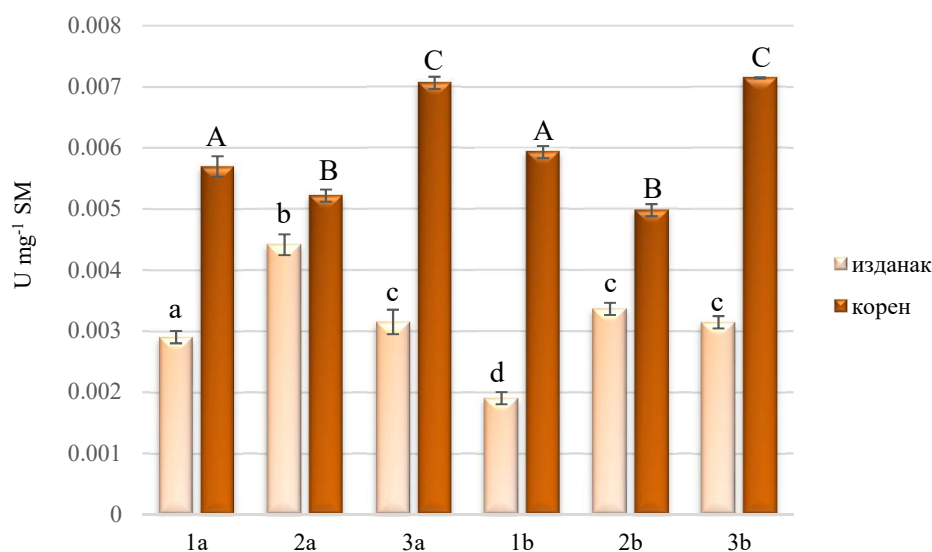


Графикон 14. Активност пирогалол пероксидазе у изданима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између корена на основу Tukey теста

1.5. Активност фенилаланин амонијум лиазе

Резултати добијени мерењем активности фенилаланин амонијум лиазе (PAL) у клијанцима *Ocimum basilicum* var. *minimum* приказани су на Графикону 15. Уочено је да постоје разлике у активности наведеног ензима, пре свега у односу на испитивани део биљке, али и у односу на концентрацију минералних елемената у коришћеним третманима.

У изданцима клијанаца гајеним у третманима са нитратном формом азота највиша активност ензима измерена је при умереној концентрацији минералних елемената и ова вредност је значајно различита у односу на остале третмане, како са нитратном, тако и са аминијачном формом исхране. И у изданцима је након примене „b“ третмана највиша активност фенилаланин амонијум лиазе евидентирана при умереној исхрани (2b третман), при чему нису утврђене статистички значајне разлике између овог и 3a и 3b третмана, али се активност ензима статистички значајно разликује у поређењу са третманима 1a, 2a и 1b. Утврђено је да је у подземним деловим клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* фенилаланин амонијум лиаза активнија у поређењу са изданцима наведеног генотипа. Међутим, када су у питању ови биљни органи, нису утврђене статистички значајне разлике између форме азотне исхране. Наведени ензим је у подземним органима најмање активан при умереној, а највише при исхрани која садржи високе концентрације минералних елемената.



Графикон 15. Активност фенилаланин амонијум лиазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између корена на основу Tukey теста

1.6. Не-ензимске компоненте одбрамбеног система

1.6.1. Количина укупних фенолних једињења

Количина укупних фенолних једињења квантификована је у изданцима и коренима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum*, а добијени резултати су приказани у Табели 15. Добијене вредности су изражене кроз еквивалент галне киселине.

У надземним органима добијене вредности су у опсегу од 30.47 до 47.41 GAE mg⁻¹ SM. Највећа количина укупних фенолних једињења измерена је при 1b третману, док је најнижа измерена при 3a третману. Додатно, између ових вредности постоји статистички значајна разлика. Највећа количина укупних фенолних једињења измерена при третману 1b праћена је измереном количином ових метаболита при 2a (46.98 GAE mg⁻¹ SM) и 1a (43.57 GAE mg⁻¹ SM) третманима, при чему између ових вредности није утврђена статистички значајна разлика.

У корену *Ocimum basilicum* var. *minimum* синтеза ове групе не-ензимских компоненти одбрамбеног система вишеструко је увећана и у опсегу је вредности од 90.68 до 184.76 GAE mg⁻¹ SM. Највећа и статистички значајно различита количина укупних фенолних једињења утврђена је при третману 2a и праћена је вредностима измереним при третману 3b (173.94 GAE mg⁻¹ SM). Најнижа количина укупних фенолних једињења (90.68 GAE mg⁻¹ SM) евидентирана је при 3a третману и статистички је значајно различита у односу на остале третмане.

Табела 15. Количина укупних фенолних једињења, количина флавоноида и укупна антиоксидативна активност у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у зависности од количине и типа нутријената

третман	количина укупних фенолних једињења (GAE mg ⁻¹ SM)		количина флавоноида (RUE mg ⁻¹ SM)		укупна антиоксидативна активност (IC ₅₀ , µg mL ⁻¹)	
	изданак	корен	изданак	корен	изданак	корен
1a	43.57 ± 0.84b	108.75 ± 0.84e	23.60 ± 0.21c	6.49 ± 0.24b	859.24 ± 1.14a	35.93 ± 0.47b
2a	46.98 ± 0.53b	184.76 ± 1.65b	22.90 ± 0.36b	7.46 ± 0.41a	309.33 ± 1.07b	22.36 ± 0.79a
3a	30.47 ± 1.19a	90.68 ± 0.89a	14.08 ± 0.29a	6.91 ± 0.17ab	174.85 ± 1.38c	34.36 ± 0.66b
1b	47.41 ± 0.80b	157.29 ± 0.25f	22.49 ± 0.21e	6.70 ± 0.21ab	805.42 ± 2.23a	27.91 ± 0.68a
2b	36.03 ± 0.45ac	110.04 ± 1.66e	14.80 ± 0.17d	6.84 ± 0.24b	174.85 ± 1.38c	48.16 ± 0.81b
3b	42.85 ± 0.88b	173.94 ± 0.66d	23.88 ± 0.12c	6.85 ± 0.38ab	977.49 ± 2.87a	28.01 ± 0.86a

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике (p < 0.05) између третмана на основу Tukey теста

1.6.2. Количина флавоноида

Количина флавоноида у изданцима и корену *Ocimum basilicum* var. *minimum* изражена кроз еквивалент рутина, варира у зависности од органа и типа нутријената. Добијени резултати су приказани у Табели 15.

Количина ове групе фенолних једињења у изданцима је у опсегу вредности од 14.08 до 23.88 RUE mg⁻¹ SM. Највише вредности (23.88 RUE mg⁻¹ SM) забележене су у изданцима при третману 3b и праћене су вредностима измереним у изданцима са 1a третмана (23.60 RUE mg⁻¹ SM). Најниже вредности количине флавоноида измерене су при 3a третману (14.08 RUE mg⁻¹ SM) и 2b третману (14.80 RUE mg⁻¹ SM). Додатно, између ових третмана је утврђена статистички значајна разлика. У подземним органима је измерена нижа количина флавоноида у односу на надземне органе, а вредности су у опсегу од 6.49 до 7.46 RUE mg⁻¹ SM. Уз постојање статистички значајне разлике, највише вредности су измерене при 2a, а најниже при 1a третману.

1.7. Укупна антиоксидативна активност

Резултати добијени мерењем укупне антиоксидативне активности различитих делова клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* приказани су у Табели 15. У изданцима су добијене IC₅₀ вредности у опсегу од 977.49 до 174.85 µg mL⁻¹. Највећу способност неутрализације DPPH радикала показали су узорци добијени из изданака гајених на 3a третману, као и изданака гајених на 2b третману (IC₅₀ = 178.38 µg mL⁻¹). Између ових вредности није утврђена статистички значајна разлика. Најнижа вредност укупне антиоксидативне активности измерена је у узорцима изданака гајених на 3b третману и праћена је вредностима добијеним за изданке гајене на 1a (IC₅₀ = 859.24 µg mL⁻¹) и 1b третману (IC₅₀ = 805.42 µg mL⁻¹). Такође, између ових вредности није утврђена статистички значајна разлика.

У подземним органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* забележена је значајно већа укупна антиоксидативна активност у поређењу са надземним органима. У корену су измерене IC₅₀ вредности у опсегу од 48.16 до 22.36 µg mL⁻¹. Највећу способности неутрализације DPPH радикала показали су узорци корена клијанаца гајених на 2a третману, али и корени клијанаца гајених на 1b третману (IC₅₀ = 27.91 µg mL⁻¹). Између вредности са ових третмана, као ни између ових и вредности са третмана 3b (IC₅₀ = 28.01 µg mL⁻¹) није утврђена статистички значајна разлика у укупној антиоксидативној активности. Најмању способност неутрализације DPPH радикала (IC₅₀

= 48.16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) показали су узорци корена клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајеног на 2b третману и ова вредност је статистички значајно различита у односу на остале третмане.

Међутим, и поред значајне разлике у односу на друге третмане, чак и најнижа укупна антиоксидативна активност корена вишеструко премашује способност неутрализације слободних радикала у односу на највишу антиоксидативну активност изданака.

1.8. Концентрација рузмаринске и кофеинске киселине

Квантификација одабраних фенолних киселина у метанолним екстрактима добијених из изданака и корена *Ocimum basilicum* var. *minimum* гајених *in vitro* применом различитих третмана извршена је HPLC методом (*eng. high-performance liquid chromatography*).

Резултати мерења концентрације рузмаринске киселине приказани су у Табели 16. У надземним органима клијанаца добијене вредности су у опсегу од 3.01 до 21.0 mg g^{-1} . Највећа количина рузмаринске киселине квантификована је у екстрактима изданака гајених на третману 3a. Додатно, између овог и осталих третмана утврђена је статистички значајна разлика у концентрацији рузмаринске киселине. Најнижа концентрација је измерена у екстрактима изданака гајених на третману 1a, при чему је, такође, између овог и осталих третмана уочена статистички значајна разлика. Између осталих третмана нису утврђене статистички значајне разлике у концентрацији рузмаринске киселине у изданцима.

Табела 16. Концентрација рузмаринске и кофеинске киселине у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* у зависности од количине и типа нутријента

третман	рузмаринска киселина (mg g^{-1})		кофеинска киселина (mg g^{-1})	
	изданак	корен	изданак	корен
1a	3.01 $\pm$ 0.2b	18.2 $\pm$ 0.9b	0.476 $\pm$ 0.03c	1.12 $\pm$ 0.08a
2a	10.6 $\pm$ 0.5c	38.8 $\pm$ 2.0a	1.10 $\pm$ 0.08a	1.45 $\pm$ 0.1a
3a	21.0 $\pm$ 1.1a	31.6 $\pm$ 1.6a	0.464 $\pm$ 0.03c	0.481 $\pm$ 0.03b
1b	8.08 $\pm$ 0.4c	21.5 $\pm$ 1.1b	0.534 $\pm$ 0.04c	1.21 $\pm$ 0.09a
2b	8.79 $\pm$ 0.5c	19.9 $\pm$ 1.0b	0.375 $\pm$ 0.03c	0.416 $\pm$ 0.03b
3b	6.17 $\pm$ 0.3c	24.6 $\pm$ 1.3b	0.699 $\pm$ 0.05b	0.296 $\pm$ 0.02c

Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

У корену је измерена већа количина рузмаринске киселине у поређењу са изданцима (у опсегу вредности од 18.2 до 38.8 mg g⁻¹). Највише рузмаринске киселине је детектовано у корену клијанаца гајених при умереној концентрацији нутријената са нитратном формом азота (третман 2a), а праћена је количином измереном применом третмана са високом концентрацијом нутријената, тј. третман 3a (31.6 mg g⁻¹). Између вредности са ових третмана нису утврђене статистички значајне разлике. Најнижа концентрација забележена је у кореновима гајеним на третману 1a. Додатно, између вредности са третмана 1a и коришћених третмана са присутним амонијумовим јонима („b“ третмани) нема статистички значајних разлика у концентрацији рузмаринске киселине.

Резултати мерења концентрације кофеинске киселине у изданцима и корену *Ocimum basilicum* var. *minimum* приказани су у Табели 16. Измерена концентрација ове фенолне киселине у изданцима је у опсегу вредности од 0.375 до 1.10 mg g⁻¹. Највећа концентрација измерена је у екстрактима изданака клијанаца гајених на третману са умереном концентрацијом нутријената и нитратном формом азота (2a третман) и између овог и осталих третмана утврђена је статистички значајна разлика. Најнижа вредност кофеинске киселине измерена је у екстрактима изданака гајених при умереној концентрацији нутријената, али у присуству амонијумових јона (2b третман), при чему није утврђена статистички значајна разлика између овог и 1a, 3a, 1b и 2b третмана.

Када су у питању подземни делови клијанаца, измерене концентрације кофеинске киселине су у опсегу вредности од 0.296 до 1.45 mg g⁻¹. Највећа количина кофеинске киселине квантификована је у екстрактима корена клијанаца гајених на 2a третману, али висока концентрација је евидентирана и при 1b (1.21 mg g⁻¹) и 1a (1.12 mg g⁻¹) третманима. Између вредности са ових третмана нису утврђене статистички значајне разлике. Најниже вредности (0.296 mg g⁻¹) евидентирани су у подземним органима биљака гајених на 3b третману, при чему се вредност са овог третмана статистички значајно разликује од вредности са осталих третмана. Као и у случају рузмаринске киселине, и концентрација кофеинске киселине је већа у подземним у односу на надземне делове клијанаца.

2. *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese

2.1. Карактеристике клијања

Карактеристике клијања семена *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese под утицајем различитог режима исхране, са KNO_3 као главним извором азота или у комбинацији са NH_4NO_3 , испитиване су мерењем средњег времена клијања (MTG), брзине клијања (RG), укупног процента клијања (GP), као и униформности клијања (U). Добијени резултати су приказани у Табели 17. Резултати добијени испитивањем карактеристика клијања указују на значајан ефекат минералне исхране на развој *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese током прве недеље. Највећи проценат клијања ($\text{GP} = 89.36\%$) забележен је при третману са високом концентрацијом нутријената и 20.4 mM KNO_3 (третман 3a), али је статистички значајна разлика утврђена између третмана са минималном концентрацијом нутријената и 6.14 mM KNO_3 (где је уједно забележен и најмањи проценат проклијалих семена) и осталих третмана. Третман 3a је уједно и третман у коме су семена *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese показала највећи степен униформног клијања ($U = 34.37$), као и највишу стопу клијања ($\text{RG} = 73.06$). Међутим, најбрже клијање се постиже при умереној концентрацији нутријената и без амонијака (MTG при третману 2a износи 2.49 проклијала семена по дану), док је статистички значајно спорије клијање забележено при високим концентрацијама нутријената уз присуство амонијака (2b и 3b третмани).

Табела 17. Карактеристике клијања семена генотипа *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота

	GP	MTG	RG	U
1a	$78.72 \pm 1.24a$	$2.54 \pm 0.07a$	$61.40 \pm 0.69a$	$30.99 \pm 1.12ac$
2a	$88.89 \pm 0.89b$	$2.49 \pm 0.06a$	$68.89 \pm 0.78a$	$35.70 \pm 1.01b$
3a	$89.36 \pm 1.31b$	$2.60 \pm 0.11a$	$73.06 \pm 0.74a$	$34.37 \pm 0.99ab$
1b	$87.50 \pm 1.31ab$	$2.64 \pm 0.31a$	$66.96 \pm 1.18a$	$33.14 \pm 0.48ab$
2b	$85.11 \pm 1.46ab$	$2.78 \pm 0.16b$	$63.52 \pm 0.87a$	$30.62 \pm 0.89c$
3b	$78.82 \pm 1.26a$	$2.86 \pm 0.12b$	$57.75 \pm 0.61a$	$27.52 \pm 1.02c$

Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења $\pm$ стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

2.2. Концентрација фотосинтетичких пигмената

Резултати добијени испитивањем карактеристика процеса фотосинтезе мерењем концентрације фотосинтетичких пигмената приказани су у Табели 18. Концентрација хлорофила *a* је у опсегу вредности од 0.4183 до 1.004 mg g⁻¹ SM. Највиша концентрација хлорофила *a* измерена је при третману 2a и праћена је концентрацијом измереном при третману 1a (0.976 mg g⁻¹ SM). Између ових вредности није утврђена статистички значајна разлика. Међутим, статистички значајан пад у концентрацији хлорофила *a* утврђен је при третману 3a, али и свим другим третманима у којима је присутан NH₄NO₃. Измерена концентрација хлорофила *b* је у опсегу вредности од 0.219 до 0.548 mg g⁻¹ SM. Исти тренд забележен је и у случају хлорофила *b*, тј. највећа концентрација овог фотосинтетичког пигмента измерена је при третману 2a. Најбољи однос хлорофила *a* и хлорофила *b* је при третманима 1a и 2a и између ових третмана није утврђена статистички значајна разлика.

Као и у случају хлорофила, и резултати добијени мерењем концентрације фотосинтетичких пигмената из групе каротеноида показали су да високе концентрације нутријената инхибирају синтезу ових фотосинтетичких пигмената (Табела 18). Измерена концентрација каротеноида је у опсегу вредности од 0.024 до 0.166 mg g⁻¹ SM. Највиша концентрација каротеноида измерена је при третману са амонијаком (1b) што може указивати на индуковану синтезу ових протектаната у присуству амонијумових јона као фактора стреса на фотосинтетичке процесе овог генотипа.

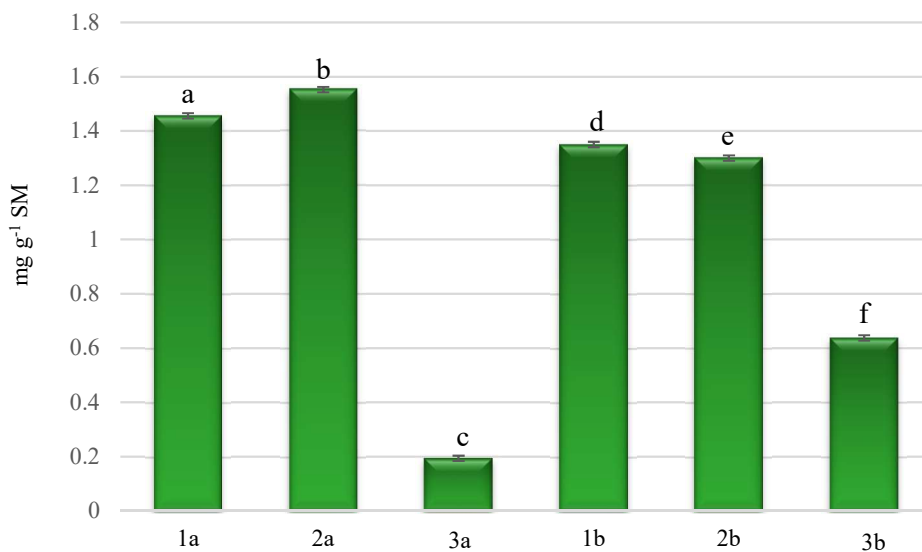
Табела 18. Концентрација хлорофила *a*, хлорофила *b*, однос хлорофила *a/b* и концентрација каротеноида (mg g⁻¹ SM) у свежим листовима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота

	хлорофил <i>a</i>	хлорофил <i>b</i>	хлорофил <i>a/b</i>	каротеноиди
1a	0.976 ± 0.01a	0.480 ± 0.04a	2.03 ± 0.001a	0.103 ± 0.01c
2a	1.004 ± 0.01ab	0.548 ± 0.01b	1.83 ± 0.01a	0.085 ± 0.02ac
3a	0.117 ± 0.01c	0.076 ± 0.01c	1.54 ± 0.06b	0.024 ± 0.003a
1b	0.893 ± 0.01d	0.458 ± 0.01d	1.95 ± 0.01a	0.166 ± 0.028bc
2b	0.788 ± 0.01e	0.512 ± 0.01e	1.55 ± 0.04b	0.059 ± 0.002ac
3b	0.418 ± 0.02f	0.219 ± 0.01f	1.91 ± 0.02a	0.074 ± 0.002ac

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

На Графикону 16 приказано је варирање у концентрацији укупног хлорофила као последица различите минералне исхране током првих месец дана *in vitro* растења и развића *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. *Genovese*. Резултати су указали да високе концентрације нутријената, како са нитратима, тако и са амонијумовим јонима као главним изворима азота, делују стресно на фундаменталне метаболичке процесе клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. *Genovese*. Статистички посматрано, у сваком од испитиваних третмана *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. *Genovese* у култури *in vitro* продукује различите концентрације фотосинтетичких пигмената. Међутим, уочљива је максимална продуктивност применом третмана ниже концентрације нутријената, као и вишеструки пад у концентрацији укупних хлорофила у третманима са високом концентрацијом нутријената (3a и 3b).

На основу ових резултата може се закључити да високе концентрације минералних елемената негативно делују на примарну продукцију *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. *Genovese* стварајући услове стреса који инхибирају синтезу фотосинтетичких пигмената.



Графикон 16. Количина укупног хлорофила у свежим листовима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. *Genovese* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey testa

2.3. Концентрација укупних солубилних протеина

Синтеза основних градивних елемената из групе протеина у директној је вези са количином доступног азота. Са друге стране, инхибирање синтезе протеина и поред високе концентрације азота директно може указивати на стресне услове средине и нарушавање процеса примарног метаболизма. Вредности добијене мерењем концентрације протеина приказане су у Табели 19.

У изданцима *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. *Genovese* измерена концентрација укупних солубилних протеина је у опсегу од 1.92 до 5.65 mg g⁻¹ SM, док је у корену у опсегу од 4.39 до 8.26 mg g⁻¹ SM. У надземним и подземним органима концентрација протеина је у директној вези са концентрацијом минералних елемената и формом азота. Додатно, делови клијанаца показали су различити тренд у синтези протеина. У изданцима гајеним на нитратним третманима концентрација протеина се статистички значајно повећава са повећањем концентрације нутријената, па је и највећа концентрација протеина измерена при третману 3a (третман са 24.6 mM KNO₃).

Амонијачна исхрана не доводи до значајнијих промена у концентрацији протеина у надземним органима и при овим третманима нису утврђене статистички значајне разлике у концентрацији протеина у односу на концентрацију минералних материја. Међутим, за разлику од изданака, максимална концентрација протеина у корену забележена је при 1b третману, док се са повећањем концентрације нутријената и NH₄NO₃ статистички значајно смањује и концентрација укупних солубилних протеина.

Табела 19. Концентрација укупних солубилних протеина (mg g⁻¹ SM) у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. *Genovese* у зависности од количине и типа нутријената

	изданак	корен
1a	1.92 ± 0.05c	5.57 ± 0.30b
2a	3.67 ± 0.08b	5.75 ± 0.13ab
3a	5.65 ± 0.26a	6.50 ± 0.28ac
1b	3.29 ± 0.03db	8.26 ± 0.20e
2b	3.32 ± 0.1d	7.33 ± 0.22c
3b	3.48 ± 0.07db	4.39 ± 0.23d

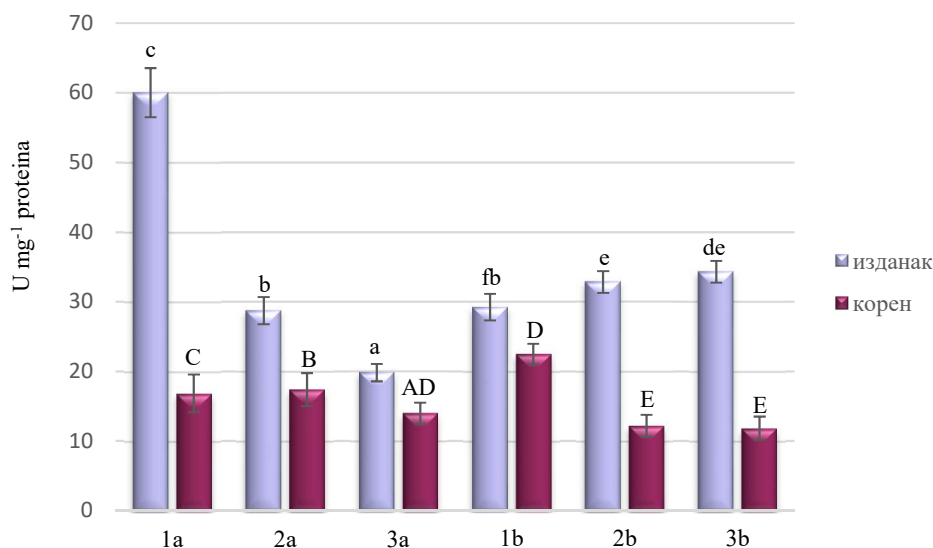
Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике (p < 0.05) између третмана на основу Tukey теста

2.4. Квантификација активности ензимских компоненти одбрамбеног система

2.4.1. Активност супероксид дисмутазе

Резултати добијени мерењем активности супероксид дисмутазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese приказани су на Графикону 17.

Висока концентрација нутријената са KNO_3 као главним извором азота довела је до статистички значајног пада у активности супероксид дисмутазе како у изданцима, тако и у корену, при чему је ензим активнији у изданцима. Како је најнижа активност супероксид дисмутазе у изданцима забележена при 3а третману, а највиша при 1а третману, може се закључити да стрес који изазива вишак нутријената са KNO_3 као главном азотном формом доводи до инхибирања активности супероксид дисмутазе. Другачији тренд у активности овог ензима утврђен је у изданцима гајеним у присуству NH_4NO_3 где је приметан пораст у активности са порастом концентрације нутријената. У корену је статистички значајно нижи ниво активности овог ензима при 2b и 3b третманима у поређењу са осталим третманима. Између вредности са ова два третмана није утврђена статистички значајна разлика у активности коренске супероксид дисмутазе. Уједно, при овим третманима је коренска супероксид дисмутаза најмање активна у поређењу са осталим третманима.

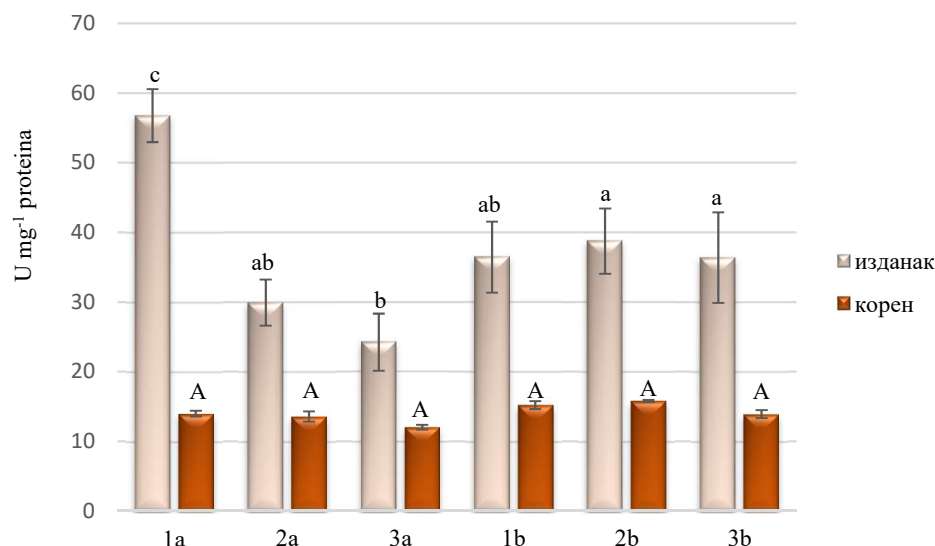


Графикон 17. Активност супероксид дисмутазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

2.4.2. Активност каталазе

Способност уклањања високореактивног водоник-пероксида испитивана мерењем активности каталазе указује на разлике у активности овог ензима у зависности од испитиваног биљног органа. Резултати мерења активности каталазе у надземним и подземним органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese приказани су на Графикону 18.

Разлике у активности наведеног ензима утврђене су како у односу на тип минералне исхране, тако и у односу на испитивани биљни орган. Висок степен сличности уочен је у активности каталазе и супероксид димутазе у изданима испитиваног генотипа. Каталаза је најактивнија при 1а третману и утврђена је статистички значајна разлика у активности каталазе при овом у односу на остале третмане. Такође је уочен и статистички значајан пад у активности каталазе са порастом концентрације нитратних третмана. Супротан тренд је забележен у активности каталазе у третманима у којима је присутан NH_4NO_3 , при чему нису утврђене статистички значајне разлике у измереним активностима. Као и у случају генотипа *Ocimum basilicum* var. *minimum*, активност каталазе не показује статистички значајне разлике у коренима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese и измерене вредности су неколико пута ниже у односу на вредности измерене у изданима истог генотипа.

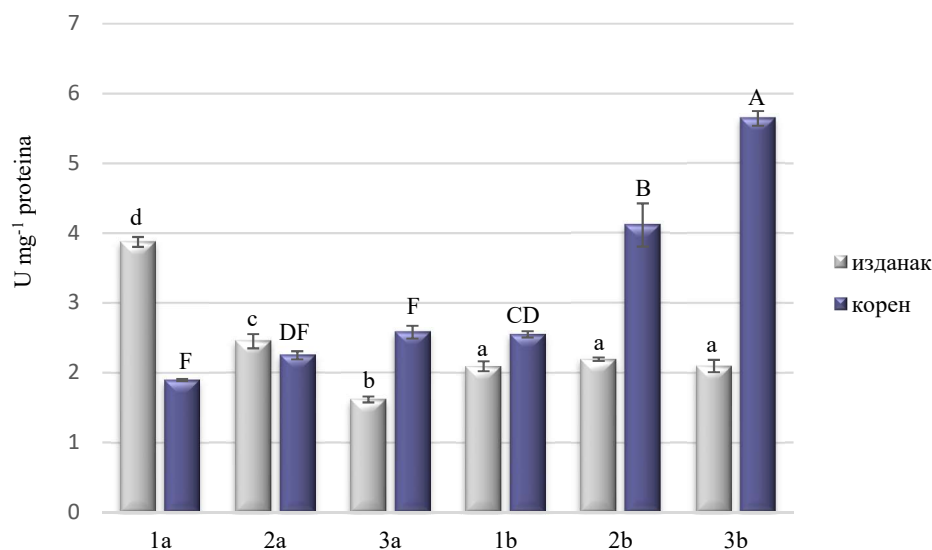


Графикон 18. Активност каталазе у изданима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

2.4.3. Активност аскорбат пероксидазе

Резултати мерења активности аскорбат пероксидазе приказани су на Графикону 19.

Утврђено је да аскорбат пероксидаза показује различит ниво активности у зависности од типа исхране, али и испитиваног биљног органа. За разлику од супероксид дисмутазе и каталазе, чија активност је виша у изданцима, аскорбат пероксидаза у клијанцима *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese је генерално активнија у корену. У изданцима је тренд активности аскорбат пероксидазе у стаблу у корелацији са активностима супероксид дисмутазе и каталазе. Највиша активност ензима забележена је при третману 1a, а најнижа при третману 3a. Између свих третмана са нитратном формом азота („a“ третмани) утврђена је статистички значајна разлика. Применом третмана који садрже NH_4NO_3 активност ензима у изданцима се статистички није значајно разликовала у односу на концентрацију минералних елемената, али се значајно разликовала у односу на „a“ третмане. Међутим, при третманима у којима у изданцима није индукована активност аскорбат пероксидазе утврђена је виша специфична активност овог ензима у коренима. Ензим је најактивнији при максималној концентрацији нутријената и 18.8 mM KNO_3 и 20.6 mM NH_4NO_3 (третман 3b). Такође, у нитратним третманима са индукованом аскорбат пероксидазом у изданцима, не постоје значајне разлике у коренским аскорбат пероксидазама.

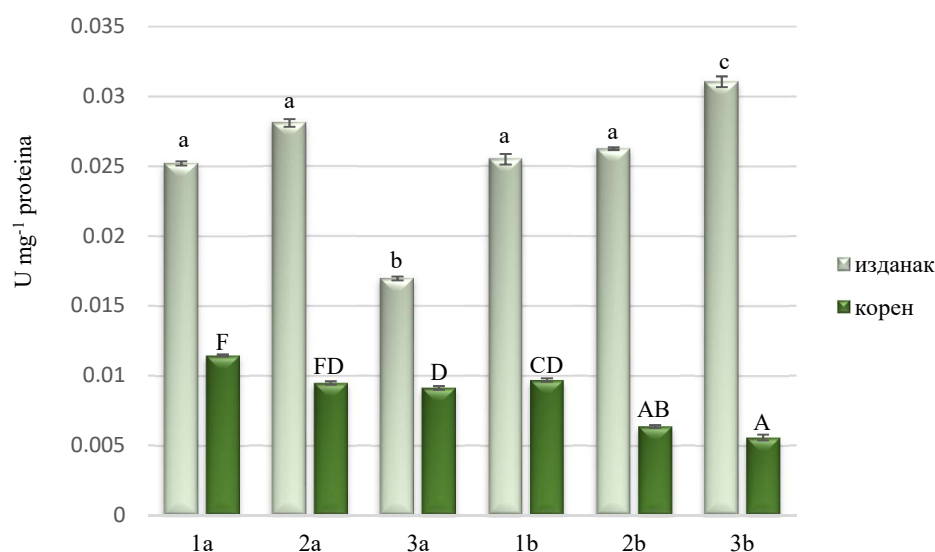


Графикон 19. Активност аскорбат пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey testa

2.4.4. Активност гвајакол пероксидазе

Резултати мерења активности гвајакол пероксидазе приказани су на Графикону 20.

Различити нивои активности гвајакол пероксидазе уочени су у зависности од испитиваног органа клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese. У изданцима, у третманима са исхраном базираном на нитратима, измерена је значајно нижа активност ензима при максималним концентрацијама нутријената (третман 3а). Уједно, утврђено је и да је активност гвајакол пероксидазе статистички значајно нижа у овом третману у поређењу са осталим третманима. Супротно нитратним третманима, у третманима са високом концентрацијом минералних елемената у којима су присутни амонијумови јони активност гвајакол пероксидазе је увећана (третман 3б) и статистички се значајно разликовала у поређењу са осталим третманима. У подземним деловима клијанаца уочен је супротан тренд у активности гвајакол пероксидазе. Наведени ензим показао је статистички значајно нижу активност при третману са 18.8 mM KNO₃ и 20.6 mM NH₄NO₃ (третман 3б). Добијени резултати указали су на значајну корелацију у активност гвајакол пероксидазе и пирогалол пероксидазе у надземним органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese.

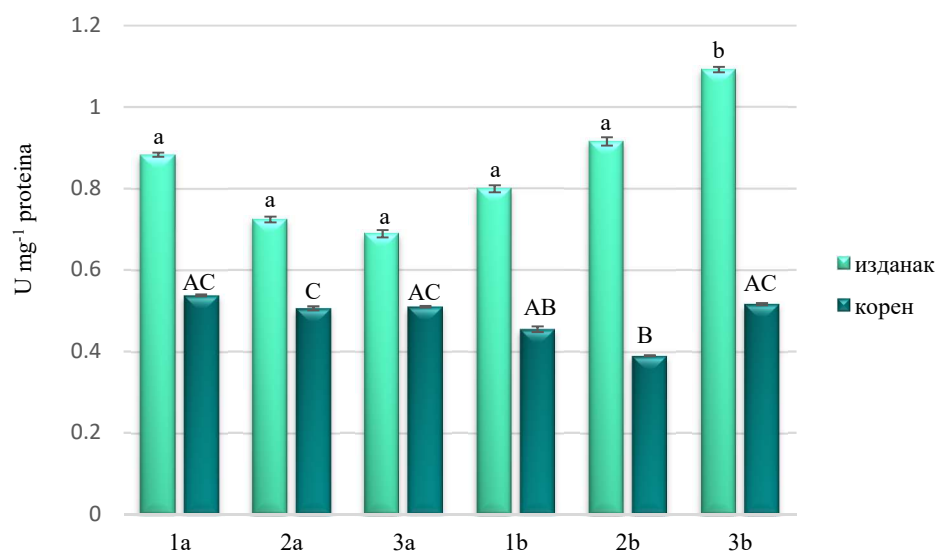


Графикон 20. Активност гвајакол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey testa

2.4.5. Активност пирогалол пероксидазе

Као и у случају гвајакол пероксидазе, пирогалол пероксидаза показује различит тренд активности у зависности како од биљног органа, тако и од типа азотне исхране. Резултати добијени мерењем активности пирогалол пероксидазе приказани су на Графикону 21.

У сваком од коришћених третмана пирогалол пероксидаза је показала већи ниво активности у изданцима односу на корене клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese. У изданцима је утврђено да у третманима са нитратном формом азота, са повећањем концентрације нутријената опада ниво активности пирогалол пероксидазе; супротно, у третманима са NH_4NO_3 и KNO_3 активност ензима расте са повећањем концентрације минералних материја. Најнижа активност забележена је при третману 3а, а највиша при третману 3б. Међутим, ни у једном од коришћених третмана нису утврђене статистички значајне разлике у добијеним вредностима. Пирогалол пероксидаза је показала другачији тренд активности у подземним органима клијанаца. Додатно, разлике између третмана су и статистички значајне. Ензим је најактивнији при најнижим концентрацијама нутријената и нитратном формом азота (1а третман), али нема статистички значајних разлика у резултатима између овог и осталих третмана, са изузетком третмана са 9.4 mM KNO_3 и 10.3 mM NH_4NO_3 (третман 2б) где је забележена најнижа активност ензима.

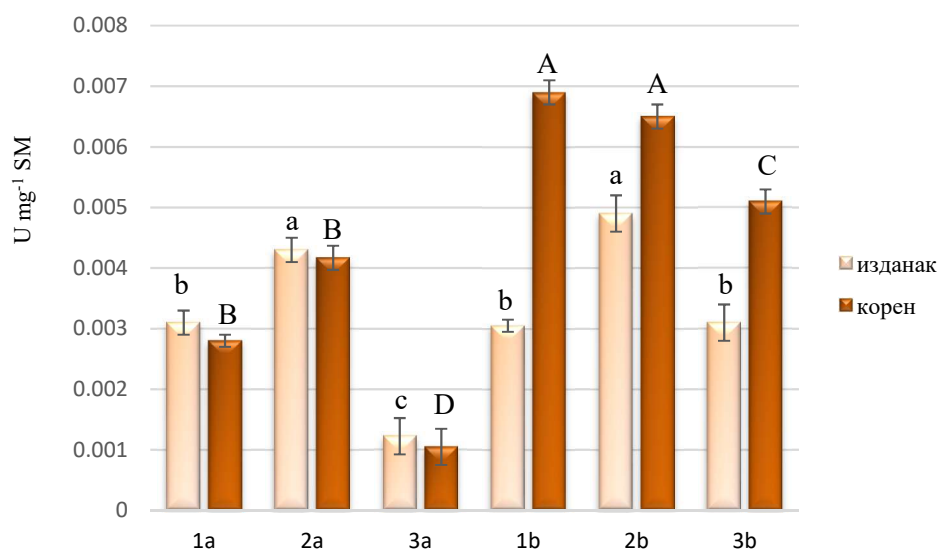


Графикон 21. Активност пирогалол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey testa

2.5. Активност фенилаланин амонијум лиазае

Резултати добијени мерењем активности фенилаланин амонијум лиазае у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. *Genovese* приказани су на Графикону 22. Поређењем добијених података уочено је да је фенилаланин амонијум лиаза показала различиту активност у органима клијанаца испитиваног генотипа, при чему је активност у директној вези са количином доступних нутријената, али и формом азота која је примењивана током четири недеље *in vitro* растења и развића.

У изданцима је активност ензима повезана, пре свега, са концентрацијом третмана, а не са обликом примењеног азота, па су максималне вредности ензимске активности добијене при третманима 2a и 2b, без статистички значајних разлика између ова два третмана. Ензим је у изданцима најмање активан при високим дозама нутријената. Активност фенилаланин амонијум лиазае из екстраката изданака гајених при третману 3b је статистички значајно различита у односу на остале третмане. У подземним органима је највиша вредност фенилаланин амонијум лиазае измерена при минималним концентрацијама нутријената и у присуству амнијумових јона (1b), али нису утврђене значајне разлике између ниских и умерених концентрација третмана, како са нитратном, тако и са комбинованом формом азота. Као и у случају изданака, ензим је најмање активан при високим концентрацијама нутријената, уз статистички значајне разлике у активности.



Графикон 22. Активност фенилаланин амонијум лиазае у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. *Genovese* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

2.6. Не-ензимске компоненте одбрамбеног система

2.6.1. Количина укупних фенолних једињења

Вредности количине укупних фенолних једињења у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese приказане су у Табели 20.

У изданцима, добијене вредности су у опсегу од 26.63 до 92.82 GAE mg⁻¹ SM. Највиша количина укупних фенолних једињења измерена је при третману 2b, док је најмања измерена при третману 1a. Како је количина укупних фенолних једињења статистички значајно различита у сваком од примењиваних третмана (изузев 2a и 3b третмана), може се закључити да на синтезу ових секундарних метаболита у изданцима значајан ефекат остварују концентрација минералних елемената и тип азотне исхране.

У коренима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese измерена количина укупних фенолних једињења је у опсегу од 59.65 до 152.16 GAE mg⁻¹ SM. У третманима са нитратима као примарним изворима азота различита концентрација минералних елемената није довела до значајних разлика у синтези фенолних једињења, пошто је утврђено да се вредности добијене при овим третманима статистички значајно не разликују. Међутим, за сваки од третмана који је поред нитратних садржао и амонијумове јоне, утврђена је статистички значајна разлика у количини укупних фенолних једињења, при чему је највећа количина измерена при 1b третману.

Табела 20. Количина укупних фенолних једињења, количина флавоноида и укупна антиоксидативна активност у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената

третман	количина укупних фенолних једињења (GAE mg ⁻¹ SM)		количина флавоноида (RUE mg ⁻¹ SM)		укупна антиоксидативна активност (IC ₅₀ , µg mL ⁻¹)	
	изданак	корен	изданак	корен	изданак	корен
1a	26.63 ± 1.03c	77.30 ± 0.96a	19.01 ± 0.12d	5.61 ± 0.27b	607.67 ± 2.19a	92.64 ± 0.95a
2a	60.65 ± 1.00b	83.99 ± 1.31a	14.19 ± 0.32b	6.59 ± 0.21a	126.67 ± 1.15b	72.87 ± 0.74b
3a	42.71 ± 0.75a	82.56 ± 1.20a	8.50 ± 0.12a	7.11 ± 0.12ac	154.32 ± 1.46b	55.91 ± 1.24b
1b	71.03 ± 1.67f	152.16 ± 1.44d	17.39 ± 0.47d	6.65 ± 0.43ac	94.87 ± 1.52c	27.65 ± 0.65c
2b	92.82 ± 0.39e	108.75 ± 0.37c	11.61 ± 0.17c	6.74 ± 0.39c	63.00 ± 0.56c	52.10 ± 0.37b
3b	57.37 ± 0.70b	59.65 ± 1.39b	8.24 ± 0.17a	6.77 ± 0.30ac	108.10 ± 1.67b	88.27 ± 1.31a

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике (p < 0.05) између третмана на основу Tukey теста

2.6.2. Количина флавоноида

Количина флавоноида, квантификована у изданцима и коренима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese и изражена кроз еквивалент рутина, варира у зависности од од концентрације нутријената и испитиваног органа клијанаца. Добијени резултати су приказани у Табели 20.

У изданцима, измерена количина ове групе фенолних једињења је у опсегу вредности од 8.24 до 19.01 RUE mg⁻¹ SM. Највећа количина (19.01 RUE mg⁻¹ SM) забележена је у изданцима са 1a третмана и праћена је вредношћу која је измерена у изданцима гајеним на третману 1b (17.39 RUE mg⁻¹ SM).

За разлику од количине укупних фенолних једињења, количина флавоноида је нижа у подземним органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese у односу на вредности добијене за надземне делове наведеног генотипа. Највећа количина измерена је при третману 3a (7.11 RUE mg⁻¹ SM). Најмања количина флавоноида измерена је при третману 1a (5.61 RUE mg⁻¹ SM) и статистички се значајно разликовала у односу на остале примењене третмане. Између осталих вредности генерално нису утврђене статистички значајне разлике, па се може закључити да на количину флавоноида код наведеног генотипа превасходно утиче концентрација минералних материја, док форма азота није пресудан фактор.

2.7. Укупна антиоксидативна активност

Резултати мерења укупне антиоксидативне активности изданака и корена клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese приказани су у Табели 20.

У изданцима су добијене IC₅₀ вредности у опсегу од 607.67 до 63.00 µg mL⁻¹. Највећа вредност способности неутрализације DPPH радикала (IC₅₀ = 63.00 µg mL⁻¹) добијена је за изданке гајене на 2b третману, а праћена је вредношћу измереној у изданцима гајеним на 1b третману (IC₅₀ = 94.87 µg mL⁻¹) и између ових вредности нису утврђене статистички значајне разлике. Најнижа вредност укупне антиоксидативне активности (IC₅₀ = 607.67 µg mL⁻¹) измерена је у изданцима гајеним на 1a третману и статистички је значајно различита у односу на остале третмане.

У подземним органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese утврђена је боља способност неутрализације слободних радикала, при чему су измерене вредности у опсегу од 92.64 до 27.65 µg mL⁻¹. Најбоља способност неутрализације DPPH радикала утврђена је за узорке

корена гајених на 1b третману ($IC_{50} = 27.65 \mu g mL^{-1}$) и статистички је значајно различита у односу на остале третмане. Најмању способност неутрализације DPPH радикала показују корени овог генотипа гајеног на 1a ($IC_{50} = 91.73 \mu g mL^{-1}$) и 3b третману ($IC_{50} = 88.27 \mu g mL^{-1}$) и ове вредности се статистички значајно не разликују међу собом, али су статистички значајно различите у односу вредности са осталих третмана. Значајном укупном антиоксидативном активношћу карактеришу се корени биљака гајених на ниским концентрацијама нутријената и комбинованом азотном исхраном (за третман 1b $IC_{50} = 27.65 \mu g mL^{-1}$).

2.8. Концентрација рузмаринске и кофеинске киселине

Резултати добијени квантификацијом одабраних фенолних киселина у метанолним екстрактима изданака и корена *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese гајених *in vitro* на различитим медијумима HPLC методом приказани су у Табели 21.

Мерењем концентрације рузмаринске киселине у надземним органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese добијене су вредности које су у опсегу од 8.81 до 44.2 mg g⁻¹. Највећа количина рузмаринске киселине измерена је у екстрактима изданака гајених на третману 1a и између овог и осталих третмана постоји статистички значајна разлика. Додатно, значајна концентрација ове киселине евидентирана је и у третманима са комбинованом формом азотне исхране али између ових „b“ третмана нису утврђене статистички значајне разлике. Најнижа концентрација рузмаринске киселине измерена је у екстрактима изданака гајених на третманима 3a (8.81 mg g⁻¹) и 2a (12.3 mg g⁻¹), без статистички значајних разлика међу третманима.

Табела 21. Концентрација рузмаринске и кофеинске киселине у изданицима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese у зависности од количине и типа нутријената

третман	рузмаринска киселина (mg g ⁻¹)		кофеинска киселина (mg g ⁻¹)	
	изданак	корен	изданак	корен
1a	44.2 ± 2.3a	27.0 ± 1.4c	0.573 ± 0.04b	0.507 ± 0.04b
2a	12.3 ± 0.6b	34.1 ± 1.8c	0.412 ± 0.03b	0.418 ± 0.03b
3a	8.81 ± 0.5b	8.21 ± 0.4a	0.215 ± 0.02a	0.250 ± 0.02a
1b	31.0 ± 1.6c	61.2 ± 3.2b	0.401 ± 0.03b	0.677 ± 0.05c
2b	28.1 ± 1.15c	56.6 ± 2.9b	0.331 ± 0.02a	0.608 ± 0.04c
3b	33.7 ± 1.8c	3.03 ± 0.2a	0.280 ± 0.02a	0.759 ± 0.05c

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

У коренима клијанаца измерена је већа концентрација рузмаринске киселине у поређењу са изданцима, при чему су вредности у опсегу од 3.03 до 61.2 mg g⁻¹. Највећа количина рузмаринске киселине је измерена у екстрактима корена са 1b третмана (61.2 mg g⁻¹) и 2b третмана (56.6 mg g⁻¹) и између ова два третмана нису утврђене статистички значајне разлике. Најнижа концентрација забележена је у кореновима гајених на третманима 3b (3.03 mg g⁻¹) и 3a (8.21 mg g⁻¹) без статистички значајне разлике међу овим третманима.

Добијене вредности за концентрацију кофеинске киселине у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese приказане су у Табели 21. Концентрација ове фенолне киселине у изданцима је у опсегу вредности од 0.215 до 0.573 mg g⁻¹. Највећа концентрација измерена је у изданцима са 1a третмана (0.573 mg g⁻¹) и праћена је концентрацијама измереним у изданцима са третмана 2a (0.412 mg g⁻¹) и 1b (0.401 mg g⁻¹). Између ових третмана нису утврђене статистички значајне разлике у концентрацији кофеинске киселине. Најнижа вредност кофеинске киселине измерена је у изданцима са 3a третмана и праћена је концентрацијом измереном у изданцима са третмана 3b (0.280 mg g⁻¹), али нису утврђене статистички значајне разлике између екстраката са ових третмана.

Када су у питању подземни органи, измерене концентрације кофеинске киселине су у опсегу вредности од 0.250 до 0.759 mg g⁻¹. Највећа количина кофеинске киселине је добијена из екстраката корена са 3b третмана (0.759 mg g⁻¹), али је висока концентрација ове фенолне киселине евидентирана и у случају 1b третмана (0.677 mg g⁻¹) и 2b третмана (0.608 mg g⁻¹), при чему између ових третмана нису утврђене статистички значајне разлике. Најниже вредности евидентирани су у коренима *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese са 3a третмана (0.250 mg g⁻¹), при чему се резултати добијени за овај третман статистички значајно разликују од резултата осталих третмана.

3. *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal

3.1. Карактеристике клијања

Прва недеља *in vitro* клијања семена *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal праћена је значајним разликама у карактеристикама клијања у односу на то при којој концентрацији минералних елемената су семена клијала, као и са којим обликом доступног азота. Резултати добијени испитивањем карактеристика клијања наведеног генотипа приказани су у Табели 22.

Највећи проценат проклијалих семена ($GP = 93.75\%$) забележен је при третману са минималном концентрацијом минералних елемената и нитратном формом азота (1a третман), а резултати указују да се са повећањем концентрације минералних елемената снижава проценат укупно проклијалих семена. Семена овог генотипа босилка у најмањем броју клијају при високим концентрацијама нутријената уз присуство амонијумових јона (за третман 3b $GP = 64.91\%$). Ова разлика у укупно проклијалим семенима је и статистички значајна. Највиши и најнижи проценат проклијалих семена праћени су највећом и најмањом униформношћу при клијању ($U = 31.99$ при 1a третману; $U = 22.46$ при 3b третману). Ове вредности се и статистички значајно разликују. Највећа брзина клијања забележена је при 2b третману ($RG = 68.97$) и праћена је вредностима при 1a третману ($RG = 67.86$), међутим нису утврђене статистички значајна разлике у добијеним резултатима за брзину клијања између коришћених третмана. Временски посматрано, семена најбоље клијају при третману 2a ($MTG = 2.73$), при чему су утврђене статистички значајне разлике у присуству амонијумових јона, где је евидентирано спорије клијање семена.

Табела 22. Карактеристике клијања семена генотипа *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота.

	GP	MTG	RG	U
1a	$93.75 \pm 1.43ad$	$2.93 \pm 0.22ab$	$67.86 \pm 1.22a$	$31.99 \pm 0.54a$
2a	$83.33 \pm 1.13bd$	$2.73 \pm 0.25a$	$65.37 \pm 0.83a$	$30.52 \pm 0.56a$
3a	$78.26 \pm 0.95bc$	$2.81 \pm 0.29a$	$60.33 \pm 1.28a$	$27.85 \pm 0.74a$
1b	$89.66 \pm 1.39d$	$2.94 \pm 0.23b$	$62.39 \pm 1.03a$	$30.49 \pm 0.27a$
2b	$79.49 \pm 1.21be$	$3.08 \pm 0.24b$	$68.97 \pm 0.94a$	$25.81 \pm 0.45b$
3b	$64.91 \pm 1.14f$	$2.89 \pm 0.19a$	$51.27 \pm 0.79a$	$22.46 \pm 0.99b$

Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења $\pm$ стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

3.2. Концентрација фотосинтетичких пигмената

Примарна продуктивност генотипа *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal, испитивана мерењем концентрације фотосинтетичких пигмената, указује на разлике у овом физиолошком аспекту у зависности од типа нутријената на којима се наведени генотип гаји. Резултати добијени мерењем концентрације фотосинтетичких пигмената приказани су у Табели 23.

Измерене концентрације хлорофила *a* су у опсегу вредности од 0.162 до 1.116 mg g⁻¹ SM. Посматрано у односу на третмане који су као главни извор азота поседовали KNO₃, са повећањем концентрације ове неорганске копоненте, као и са повећањем концентрације осталих минералних материја, продуктивност је статистички значајно опадала. Највећа концентрација хлорофила *a* забележена је при 1a, а најнижа при 3a третману и ове вредности се статистички значајно разликују. Међутим, применом третмана у којима је KNO₃ у комбинацији са NH₄NO₃, приметан је супротан тренд, па је у овом случају највећа концентрација хлорофила *a* забележена при 2b и 3b третманима. Између наведених третмана утврђена је и статистички значајна разлика у односу на концентрацију овог пигмента. Измерена концентрација хлорофила *b* је у опсегу вредности од 0.117 до 0.875 mg g⁻¹ SM. Исти тренд је забележен и за хлорофил *b*, пошто је и у случају овог пигмента највиша вредност забележена при 1a третману (0.875 mg g⁻¹ SM), а најнижа при третману 3a (0.117 mg g⁻¹ SM), а добијене вредности су и статистички значајно различите. Додатно, између „b“ третмана нису утврђене статистички значајне разлике у концентрацији хлорофила *b*.

Табела 23. Концентрација хлорофила *a*, хлорофила *b*, однос хлорофила *a/b* и концентрација каротеноида (mg g⁻¹ SM) у свежим листовима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота

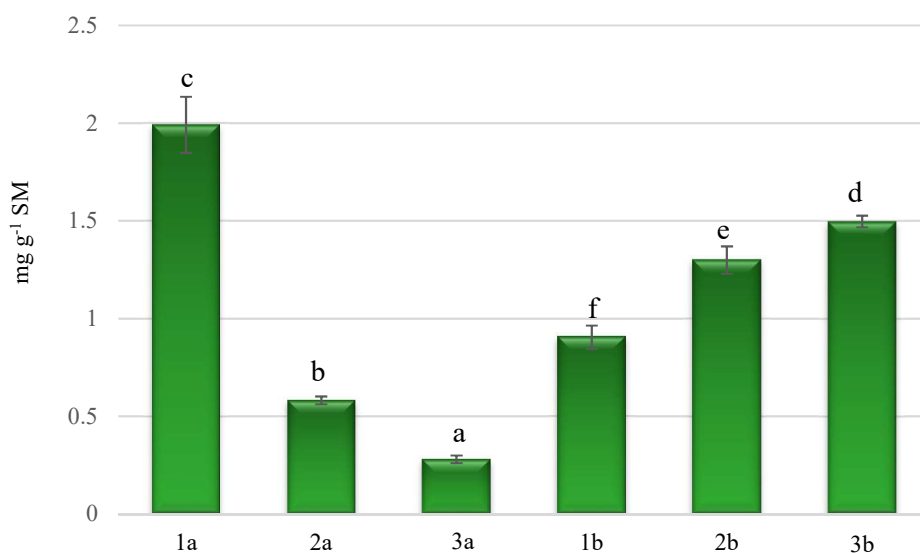
	хлорофил <i>a</i>	хлорофил <i>b</i>	хлорофил <i>a/b</i>	каротеноиди
1a	1.116 ± 0.033c	0.875 ± 0.11d	1.295 ± 0.13a	0.011 ± 0.001a
2a	0.359 ± 0.01ab	0.222 ± 0.02cb	1.625 ± 0.12a	0.006 ± 0.001a
3a	0.162 ± 0.01a	0.117 ± 0.01b	1.4 ± 0.13a	0.013 ± 0.005a
1b	0.499 ± 0.01fb	0.405 ± 0.06ac	1.66 ± 0.35a	0.037 ± 0.001a
2b	0.823 ± 0.01e	0.476 ± 0.07ac	1.27 ± 0.2ba	0.062 ± 0.003b
3b	0.925 ± 0.09d	0.571 ± 0.07a	1.77 ± 0.29a	0.066 ± 0.004b

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

Однос хлорофила *a* и хлорофила *b* показује знатно ниже вредности у поређењу са осталим генотиповима коришћеним у овим истраживањима, али између коришћених третмана нису утврђене статистички значајне разлике у односу ових фотосинтетичких пигмената.

Фотосинтетички пигменти из групе каротеноида показују знатно ниже вредности у измереним концентрацијама у односу на хлорофиле. Резултати добијени мерењем концентрација каротеноида приказани су у Табели 23. Измерене вредности су у опсегу од 0.006 до 0.066 mg g⁻¹ SM. Међутим, концентрација ових пигмената само делимично прати концентрације фотосинтетичких пигмената из групе хлорофила, пошто је евидентирано статистички значајно увећане концентрације каротеноида при третманима 2b и 3b, где највероватније делују антиоксидативно услед високих концентрација нутријената укључујући и NH₄NO₃.

Посматрано кроз укупну концентрацију фотосинтетичких пигмената, могу се увидети значајне разлике које постоје у синтези ових пигмената у односу на доступност минералних елемената, али, пре свега, разлике постоје у односу на изворе азота. Количина укупног хлорофила у свежим листовима *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у односу на минералну исхрану приказана је на Графикону 23.



Графикон 23. Количина укупног хлорофила у свежим листовима клијанца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

Евидентан је другачији тренд у синтези фотосинтетичких пигмената који постоји у одсуству, односно, у присуству NH₄NO₃. Када клијанци *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у условима *in vitro* расту и развијају се у присуству само KNO₃, са повећањем концентрације

минералних елемената снижава се примарна продукција. У овом случају, при третману 3а, синтеза фотосинтетичких пигмената је вишеструко смањена. Уколико се растење и развиће клијанаца одвија у присуству NH_4NO_3 , са повећањем концентрације нутријената интензивира се и синтеза фотосинтетичких пигмената и највећа вредност је забележена при третману 3b. Може се закључити да доминантну улогу у фотосинтетичкој продукцију *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal има тип азотне исхране у односу на концентрацију осталих минералних елемената.

3.3. Концентрација укупних солубилних протеина

Резултати концентрације укупних солубилних протеина приказани су у Табели 24.

Вредности измерене у изданцима су у опсегу од 11.53 до 18.53 mg g^{-1} SM, а у коренима од 9.79 до 18.61 mg g^{-1} SM. Највећа концентрација укупних солубилних протеина изданка измерена је при 3b третману (18.53 mg g^{-1} SM) и праћена је концентрацијом измереном при третманима 2a (17.33 mg g^{-1} SM) и 3a (16.22 mg g^{-1} SM).

У подземним органима најнижа концентрација (18.61 mg g^{-1} SM) забележена је при третману 3a и праћена је концентрацијама измереним при третманима 3b (17.53 mg g^{-1} SM) и 2b (16.45 mg g^{-1} SM). Синтеза протеина је још један од облика примарне продукције, међутим, ни у изданцима ни у корену генотипа *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal није утврђена статистички значајна разлика у концентрацији укупних солубилних протеина, како у односу на концентрацију минералних елемената, тако и у односу на тип азотне исхране.

Табела 24. Концентрација укупних солубилних протеина (mg g^{-1} SM) у изданцима и коренима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената

	изданак	корен
1a	11.93 ± 0.83a	10.87 ± 0.67a
2a	17.33 ± 2.69a	13.70 ± 0.17a
3a	16.22 ± 3.29a	18.61 ± 2.78a
1b	11.53 ± 0.33a	9.79 ± 1.49a
2b	14.15 ± 0.68a	16.45 ± 2.60a
3b	18.53 ± 0.67a	17.53 ± 2.01a

Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

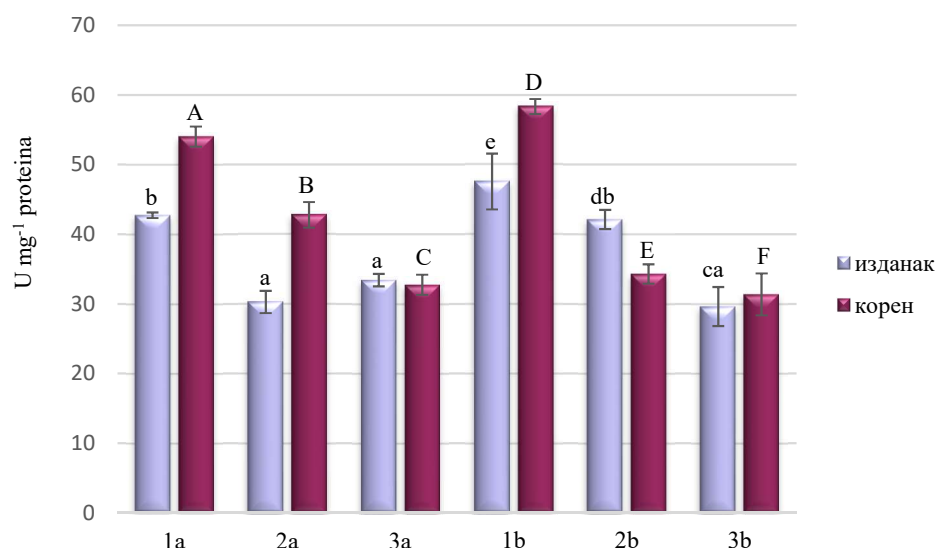
3.4. Активност ензимских компоненти одбрамбеног система

3.4.1. Активност супероксид дисмутазе

Резултати добијени мерењем активности супероксид дисмутазе у изданцима и у корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal приказани су на Графикону 24.

Специфична активност овог ензима показује различите нивое, пре свега у зависности од испитиваних органа клијанаца. Када су у питању надземни органи, ензим супероксид дисмутаза је најактивнији у третманима са ниском концентрацијом нутријената (третмани 1a и 1b). Додатно, статистички значајна разлика је забележена при 1b третману, како у односу на 1a, тако и у односу на остале третмане. Повећање концентрације доступних нутријената инхибира активност супероксид дисмутазе у изданцима, па је ензим најмање активан при 2a, 3a и 3b третманима, али без статистички значајних разлика.

Активност супероксид дисмутазе у корену показује исти тренд, међутим, између свих третмана је утврђена статистички значајна разликуја у активности овог ензима. Упоређујући добијене вредности за различите изворе азота може се увидети да је присуство NH_4NO_3 довело до повећане активности супероксид дисмутазе у односу на третмане базиране на нитратним изворима азота. Додатно, ензим је знатно активнији у корену у односу на изданке.

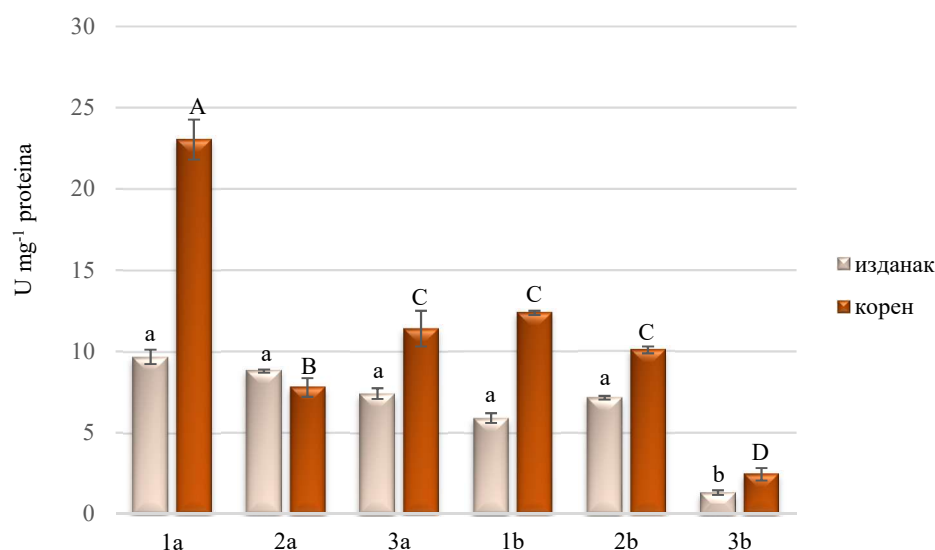


Графикон 24. Активност супероксид дисмутазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

3.4.2. Активност каталазе

Активност каталазе у клијанцима *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal показала је статистички значајна варирања у односу на испитивани орган, али и у односу на концентрацију минералних елемената у третманима. Резултати мерења активности каталазе у надземним и подземним органима наведеног генотипа приказани су на Графикону 25.

За разлику од *Ocimum basilicum* var. *minimum* и *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese, где је забележен виши ниво активности овог ензима у изданцима уз неиндуковану коренску активност, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal генерално карактерише значајнији ниво активности ензима каталазе у корену. Показано је да је каталаза најактивнија у корену при 1a третману, као и да је активност овог ензима статистички значајно инхибирана при 2a и 3b третманима. Између третмана 3a, 1b и 2b нису утврђене статистички значајне разлике. Такође је и у изданцима забележена највећа активност каталазе при 1a, а најмања при 3b третману, али је статистички значајна разлика у активности утврђена једино у изданцима са 3b третмана, док између осталих третмана није утврђена статистички значајна разлика. Додатно, коренске каталазе карактерише виши ниво активности у односу на изданке наведеног генотипа.

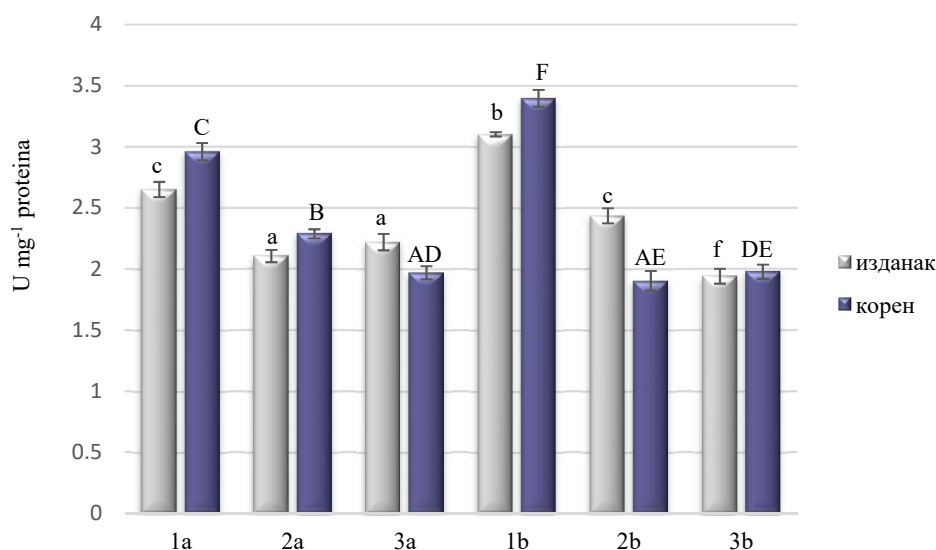


Графикон 25. Активност каталазе у изданцима и корену клијанца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey testa

3.4.3. Активност аскорбат пероксидазе

Резултати добијени мерењем активности аскорбат пероксидазе приказани су на Графикону 26.

Иако за супероксид дисмутазу и каталазу нису показане корелације у активности у клијанцима *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal, упоређујући резултате добијене мерењем активности супероксид дисмутазе и аскорбат пероксидазе може се увидети да ова два ензима показују висок ниво повезаности у својим активностима. Активност аскорбат пероксидазе показала је како дозну, тако и зависност у односу на испитивани биљни део, али и примењени нитрогени третман. У изданцима наведеног генотипа аскорбат пероксидаза је најактивнија при 1b третману и ниво ове активности показује статистички значајну разлику у односу на остале третмане. Даље, активност је индукована и при третманима 1a и 2b (између којих нису утврђене статистички значајне разлике), а најнижа активност измерена је при третману 3b (статистички значајно различита у односу на остале третмане). Исти ензим је и у корену најактивнији при третману 1b, а измерена активност је виша у односу на изданке и статистички различита у односу на остале третмане. Најниже вредности измерене су при коришћењу третмана 2b, 3b и 3a и између ових вредности нису утврђене статистички значајне разлике у активности наведеног ензима.

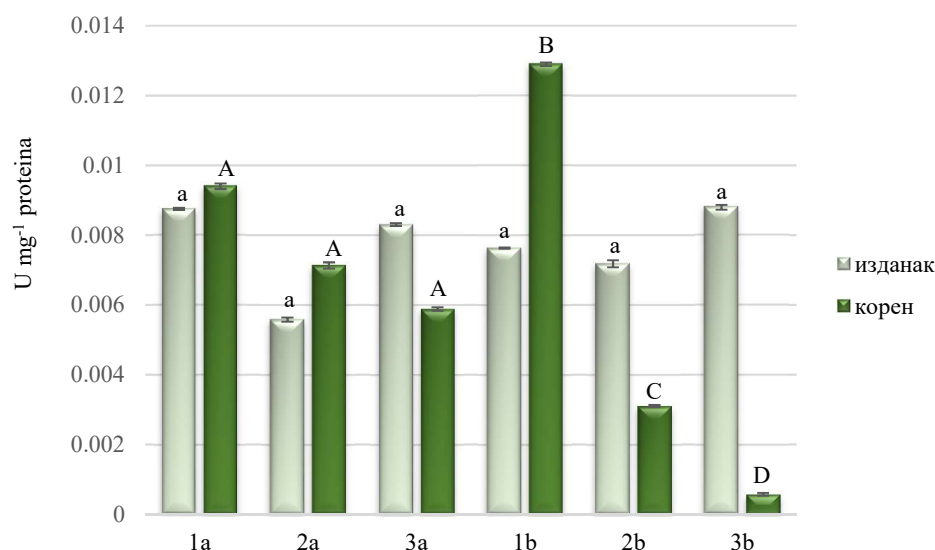


Графикон 26. Активност аскорбат пероксидазе у изданцима и корену клијанца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

3.4.4. Активност гвајакол пероксидазе

Способност неутрализације водоник-пероксида, мерена кроз активност гвајакол пероксидазе, указује на значајне разлике у активности овог ензима у односу на коришћену форму азота. Резултати мерења активности гвајакол пероксидазе у различитим органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal приказани су на Графикону 27.

Када су у питању изданци, из добијених резултата је уочено да у оквиру третмана у којима је KNO_3 главни извор азота, не постоји статистички значајна разлика у активности гвајакол пероксидазе. Исти резултати су добијени за изданке гајене на третманима у којима је коришћена комбинација KNO_3 и NH_4NO_3 . Може се закључити да гвајакол пероксидаза није један од главних облика ензимских компоненти одбрамбеног система у изданцима *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal. Међутим, у подземним органима клијанаца уочен је другачији образац активности овог ензима. Са порастом концентрације нутријената евидентиран је пад у активности аскорбат пероксидазе, али ови резултати не показују статистички значајне разлике за подземне делове биљака гајених у нитратним третманима. Када је коришћена комбинација KNO_3 и NH_4NO_3 добијене су значајно више вредности при 1b третману, али је уочен и пад у активности при третманима 2b и 3b. Разлике у резултатима за сва три наведена третмана јесу статистички значајне.

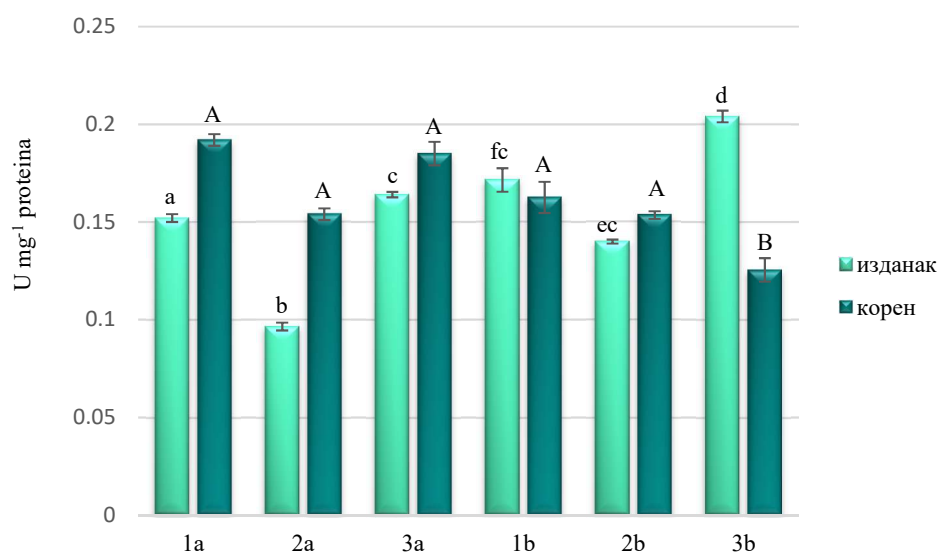


Графикон 27. Активност гвајакол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

3.4.5. Активност пирогалол пероксидазе

Резултати мерења активности пирогалол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal приказани су на Графикону 28.

Док је специфична активност гвајакол пероксидазе превасходно везана за корен, активност пирогалол пероксидазе је израженија у изданцима. Изузев третмана 1b, где је измерена незнатно виша активност овог ензима у изданцима него у корену, у осталим третманима пирогалол пероксидаза је показала виши ниво активности у корену него у изданцима. Међутим, између третмана није утврђена статистички значајна разлика у коренској активности пирогалол пероксидазе, са изузетком третмана 3b у коме је измерена активност коренске пирогалол пероксидазе најнижа, и уједно статистички значајно различита у односу на остале третмане. У изданцима је најнижа измерена активност овог ензима при третману 2a и статистички је значајно различита у односу на остале третмане. Највиша активност пирогалол пероксидазе изданака измерена је при третману 3b и статистички је значајно различита у односу на остале третмане. Било који извор азота да је у примењиван, пирогалол пероксидаза показује исти тренд у активности – најниже вредности су у умереним концентрацијама нутријената, док високе концентрације нутријената повећавају активност овог ензима. Додатно, ензим је активнији у присуству NH_4NO_3 .



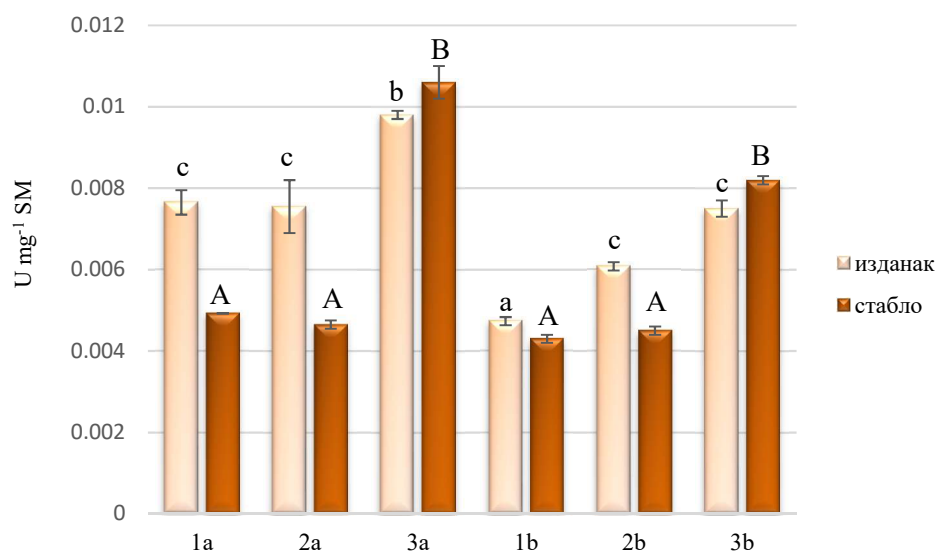
Графикон 28. Активност пирогалол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

3.5. Активност фенилаланин амонијум лиазае

Резултати добијени мерењем активности фенилаланин амонијум лиазае у клијанцима генотипа *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal приказани су на Графикону 29.

На основу добијених резултата може се увидети да је активност овог ензима варијала у биљним органима у зависности од количине минералних елемената, али не и форме доступног азота. У изданцима је активност фенилаланин амонијум лиазае условљена, пре свега, концентрацијом нутријената, при чему је ензим статистички значајно активнији при високој концентрацији нутријената са нитратном формом азота (третман 3а) у односу на остале третмане. Додатно, најнижа активност ензима забележена је при најнижој концентрацији нутријената и у присуству амонијумових јона (третман 1b) уз статистички значајне разлике у односу на остале третмане.

Са изузетком третмана са високим концентрацијама нутријената, умерене и ниске концентрације минералних елемената довеле су до већих активности фенилаланин амонијум лиазае у изданцима у односу на корен. Међутим, пролонгирани нутритивни стрес и висока концентрација макро- и микронутријената (било са нитратном или комбинованом азотном формом) довела је до повећања у активности фенилаланин амонијум лиазае у коренима, па је овај ензим најактивнији у коренима биљака гајених при 3а и 3b третманима. Између резултата ова два третмана нису уочене статистички значајне разлике.



Графикон 29. Активност фенилаланин амонијум лиазае у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

3.6. Не-ензимске компоненте одбрамбеног система

3.6.1. Количина укупних фенолних једињења

Вредности количине укупних фенолних једињења у изданцима и коренима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal приказане су у Табели 25.

У изданцима су добијене вредности у опсегу од 43.28 до 107.05 GAE mg⁻¹ SM. Највећа количина укупних фенола измерена је у изданцима гајеним на 1b третману, при чему је утврђена статистички значајна разлика између резултата овог и осталих третмана. Најмања количина измерена је у изданцима гајеним на 3a третману, при чему се и овај третман статистички значајно разликује у поређењу са резултатима добијеним за остале третманима.

У корену је евидентиран супротни тренд у синтези фенолних једињења у поређењу са изданцима, при чему је измерена количина укупних фенолних једињења у опсегу од 82.42 до 152.59 GAE mg⁻¹ SM. Највећа и статистички значајно различита количина у односу на остале третмане измерена је у коренима са 3a третмана. Такође, и у коренима гајеним на 2b третману забележена је значајна количина укупних фенолних једињења (143.35 GAE mg⁻¹ SM), статистички значајно различита у поређењу са осталим третманима. Најмања количина укупних фенолних једињења у коренима биљака са 1a третмана праћена је и ниском количином ових метаболита при 1b третману (96.66 GAE mg⁻¹ SM), при чему нису утврђене статистички значајне разлике између ових третмана.

Табела 25. Количина укупних фенолних једињења, количина флавоноида и укупна антиоксидативна активност у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената

третман	количина укупних фенолних једињења (GAE mg ⁻¹ SM)		количина флавоноида (RUE mg ⁻¹ SM)		укупна антиоксидативна активност (IC ₅₀ , µg mL ⁻¹)	
	изданац	корен	изданац	корен	изданац	корен
1a	79.44 ± 0.65bc	82.42 ± 0.46c	10.59 ± 0.44b	6.01 ± 0.12a	63.20 ± 1.30a	60.64 ± 0.89b
2a	85.12 ± 1.06b	125.26 ± 0.85b	10.54 ± 0.27b	6.59 ± 0.12a	66.45 ± 0.69a	41.79 ± 0.70b
3a	43.28 ± 1.51a	152.59 ± 0.38a	5.40 ± 0.17a	6.07 ± 0.11a	176.86 ± 1.60b	35.24 ± 0.98b
1b	107.05 ± 0.92c	96.66 ± 1.22c	11.14 ± 0.38bd	11.10 ± 0.29b	34.98 ± 0.85c	34.20 ± 0.62b
2b	94.66 ± 0.89d	143.35 ± 1.16c	10.36 ± 0.12bc	10.36 ± 0.03b	61.39 ± 1.02a	26.03 ± 0.44a
3b	70.04 ± 0.99c	103.21 ± 1.53d	7.26 ± 0.30c	6.19 ± 0.47a	81.64 ± 0.76a	55.57 ± 0.51b

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике (p < 0.05) између третмана на основу Tukey теста

3.6.2. Количина флавоноида

Количина флавоноида квантификована у изданцима и коренима *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal и изражена кроз еквивалент рутина варира у зависности од дела клијанаца и типа нутријената. Добијени резултати су приказани у Табели 25.

У изданцима су добијене вредности у опсегу од 5.40 до 11.14 RUE mg⁻¹ SM, при чему је уочен дозно-зависни тренд у синтези, тј. са повећањем концентрације доступних нутријената снижава се количина ових метаболита. Највећа количина измерена је у изданцима гајеним на 1b третману (11.14 RUE mg⁻¹ SM) и праћена је вредностима измереним у изданцима са третмана 1a (10.59 RUE mg⁻¹ SM) и 2a (10.54 RUE mg⁻¹ SM). Најмања количина флавоноида измерена је у изданцима гајеним на 3a третману (5.40 RUE mg⁻¹ SM) и 3b третману (7.26 RUE mg⁻¹ SM) и ови резултати су статистички значајно различити.

У подземним органима су добијене вредности за количину флавоноида у опсегу од 6.01 до 11.10 RUE mg⁻¹ SM. Највећа количина је измерена у коренима са 1b третмана и праћена је количином измереном у коренима са третмана 2b (10.36 RUE mg⁻¹ SM), при чему нису утврђене статистички значајне разлике у резултатима између ова два третмана. Најмања количина евидентирана је у коренима са третмана 1a, али нису утврђене статистички значајне разлике између овог и 2a, 3a и 3b третмана.

3.7. Укупна антиоксидативна активност

Резултати добијени мерењем укупне антиоксидативне активности у различитим деловима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal приказани су у Табели 25.

У изданцима су добијене вредности у опсегу од 176.86 до 34.98 µg mL⁻¹. Најбољу способност неутрализације DPPH радикала показали су изданци са 1b третмана (IC₅₀ = 34.98 µg mL⁻¹). Додатно, ова вредност је статистички значајно различита у односу на остале третмане. Најнижа вредност укупне антиоксидативне активности измерена је у екстрактима изданака гајених на 3a третману и статистички је значајно различита у односу на вредности добијене применом осталих третмана. Између третмана 1a, 2a, 2b и 3b нису утврђене статистички значајне разлике у укупној антиоксидативној активности изданака.

У подземним органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal забележена укупна антиоксидативна активност је у опсегу вредности од 60.64 до 26.03 µg mL⁻¹.

Најбољу способност неутрализације DPPH радикала показали су корени биљака гајених на 2b третману и ова вредност је статистички значајно различита у односу на остале третмане.

3.8. Концентрација рузмаринске и кофеинске киселине

Резултати добијени квантификацијом одабраних фенолних киселина у метанолним екстрактима HPLC методом из надземних и подземних органа клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal гајених *in vitro* на различитим медијумима приказани су у Табели 26.

Вредности за концентрацију рузмаринске киселине у изданцима у опсегу су од 24.9 до 44.3 mg g⁻¹. Највећа концентрација рузмаринске киселине утврђена је за екстракте изданака гајених на нитратним третманима са високом концентрацијом минералних материја (третман 3a), али су значајне вредности измерене и применом третмана 1a (38.9 mg g⁻¹), као и третмана 1b (36.1 mg g⁻¹). Између ових третмана није утврђена статистички значајна разлика у концентрацији рузмаринске киселине. Најнижа концентрација измерена је у екстрактима изданака гајених на третманима са умереном концентрацијом нутријената уз присуство NH₄NO₃ (24.9 mg g⁻¹ при третману 2b) и праћена је концентрацијом рузмаринске киселине у изданцима са третмана 3b (26.9 mg g⁻¹), без статистички значајних разлика међу вредностима са ових третмана.

У коренима клијанаца измерене вредности су у опсегу од 19.6 до 42.4 mg g⁻¹. Највећа концентрација рузмаринске киселине је измерена у коренима клијанаца са третмана 1a, уз статистички значајне разлике у односу на остале третмане. Најнижа концентрација забележена је у коренима са третмана 2b, уз статистички значајне разлике у поређењу са осталим третманима.

Табела 26. Концентрација рузмаринске и кофеинске киселине у изданцима и корену клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal у зависности од количине и типа нутријената

третман	рузмаринска киселина (mg g ⁻¹)		кофеинска киселина (mg g ⁻¹)	
	изданак	корен	изданак	корен
1a	38.9 ± 2.0a	42.4 ± 2.2a	0.316 ± 0.02a	0.351 ± 0.03a
2a	28.8 ± 1.5b	33.8 ± 1.8b	0.283 ± 0.02a	0.183 ± 0.01a
3a	44.3 ± 2.3a	31.4 ± 1.6b	0.212 ± 0.02a	0.171 ± 0.01a
1b	36.1 ± 1.9a	27.6 ± 1.4b	0.278 ± 0.02a	0.214 ± 0.02a
2b	24.9 ± 1.3b	19.6 ± 1.00c	0.174 ± 0.01a	0.121 ± 0.01a
3b	26.9 ± 1.4b	29.4 ± 1.5b	0.155 ± 0.01a	0.147 ± 0.01a

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике (p < 0.05) између третмана на основу Tukey теста

Мерењем концентрације кофеинске киселине у надземним и подземним органима клијанаца *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal добијене су вредности приказане у Табели 26.

Концентрација ове фенолне киселине у надземним органима клијанаца је у опсегу вредности од 0.155 до 0.316 mg g⁻¹. Највећа концентрација кофеинске киселине измерена је у екстрактима изданака са 1a третмана и праћена је концентрацијама измереним у екстрактима изданака гајеним на третманима 2a (0.283 mg g⁻¹) и 1b (0.278 mg g⁻¹). Између ових третмана није утврђена статистички значајна разлика у концентрацији кофеинске киселине. Најнижа вредност кофеинске киселине измерена је у екстрактима изданака гајених на 3b третману и праћена је концентрацијом измереном у екстрактима изданака са третмана 2b (0.174 mg g⁻¹), али није утврђена статистички значајна разлика између вредности са ових третмана.

Када је у питању корен, измерене концентрације кофеинске киселине су у опсегу вредности од 0.121 до 0.351 mg g⁻¹. Највећа концентрација кофеинске киселине измерена је у екстрактима подземних органа гајених на 1a третману, и измерена вредност је већа у односу на највећу концентрацију кофеинске киселине у изданцима. Додатно, значајна концентрација ове фенолне киселине евидентирана и у случају коренова са 1b третмана (0.214 mg g⁻¹), при чему између ових вредности нису утврђене статистички значајне разлике. Најниже вредности евидентирани су у коренима биљака при третману 2b (0.121 mg g⁻¹), при чему се вредности кофеинске киселине измерене при овом третману статистички значајно не разликују од осталих третмана.

4. *Ocimum* x *citriodorum*

4.1. Карактеристике клијања

Резултати добијени евидентирањем карактеристика клијања током прве недеље *in vitro* развоја *Ocimum* x *citriodorum* указују на негативне ефекте високе концентрације микро и макроелемената на семена ове сорте босиљка. Добијене вредности су приказане у Табели 27.

Генерално, наведени генотип карактерише висок проценат укупно проклијалих семена, пошто је у сваком од коришћених третмана проценат проклијалих семена био већи од 90%. Највећи проценат укупно проклијалих семена забележен је при третману 1b (GP = 97.78%) и статистички се значајно разликује у односу на остале третмане. Третман који карактерише највећи проценат проклијалих семена је уједно и третман са најуниформнијим клијањем (при третману 1b U = 42.70). Додатно, значајна униформност у клијању се постиже и применом третмана 2a, док су при осталим третманима забележене знатно ниже вредности униформног клијања. Као најпогоднији третман за постизање брзог и униформног клијања показао се 2a третман, тј. третман са умереном концентрацијом минералних елемената и 12.36 mM KNO₃. При овом третману средње време клијања (MTG) је износило 2.24 дана и овај резултат је статистички значајно различит у односу на остале третмане. Највећа брзина клијања (RG), измерена такође при овом третману, износила је 74.31 и статистички је значајно различита у односу на остале третмане. У поређењу са осталим испитиваним генотиповима босиљка, семена *Ocimum* x *citriodorum* карактерише највећи проценат проклијалих семена, при чему ова семена клијају најбрже и у најкраћем временском периоду.

Табела 27. Карактеристике клијања семена генотипа *Ocimum* x *citriodorum* при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота

	GP	MTG	RG	U
1a	91.11 ± 0.19a	2.41 ± 0.13a	66.67 ± 1.27a	37.80 ± 0.45ac
2a	91.67 ± 0.26a	2.24 ± 0.11b	74.31 ± 1.61b	40.92 ± 1.13abd
3a	91.49 ± 0.41a	2.60 ± 0.14c	62.13 ± 1.14a	35.19 ± 1.25ce
1b	97.78 ± 0.68b	2.29 ± 0.10a	72.11 ± 1.23a	42.70 ± 1.18d
2b	90.91 ± 0.49a	2.42 ± 0.15a	71.21 ± 1.13a	37.57 ± 0.89ac
3b	91.30 ± 1.07a	2.44 ± 0.15a	71.61 ± 0.98a	37.42 ± 0.35ac

Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике (p < 0.05) између третмана на основу Tukey теста

4.2. Концентрација фотосинтетичких пигмената

Резултати добијени мерењем концентрације фотосинтетичких пигмената у свежим листовима *Ocimum x citriodorum* приказани су у Табели 28.

Измерена концентрација хлорофила *a* је у опсегу вредности од 0.119 до 0.443 mg g⁻¹ SM. Највећа концентрација ове групе фотосинтетичких пигмената измерена је при третману 1a и праћена је концентрацијом истих пигмената при третману 1b (0.404 mg g⁻¹ SM). Између ових вредности није утврђена статистички значајна разлика. Најнижа концентрација хлорофила *a* измерена је при високој концентрацији нутријената у присуству амонијумових јона (третман 3b). Нитратне третмане са високом концентрацијом минералних елемената карактерише ниска концентрација хлорофила *a* (0.174 mg g⁻¹ SM при третману 3a). Измерена концентрација хлорофила *b* је у опсегу вредности од 0.057 до 0.196 mg g⁻¹ SM, а највеће концентрације ове групе пигмената су забележене при третманима 1b (0.196 mg g⁻¹ SM) и 1a (0.182 mg g⁻¹ SM), при чему нема статистички значајних разлике између наведених третмана. Додатно, однос хлорофила *a* и *b* има највеће вредности у условима нижих концентрација минералних елемената, а снижене вредности при 3a третману указују на стресне услове средине који инхибирају синтезу фотосинтетичких пигмената.

Концентрација фотосинтетичких пигмената из групе каротеноида у опсегу је вредности од 0.021 до 0.086 mg g⁻¹ SM и добијене вредности су у корелацији са са концентрацијом хлорофила *a* и хлорофила *b*, тј. највећа концентрација каротеноида измерена је при третманима 1a и 1b.

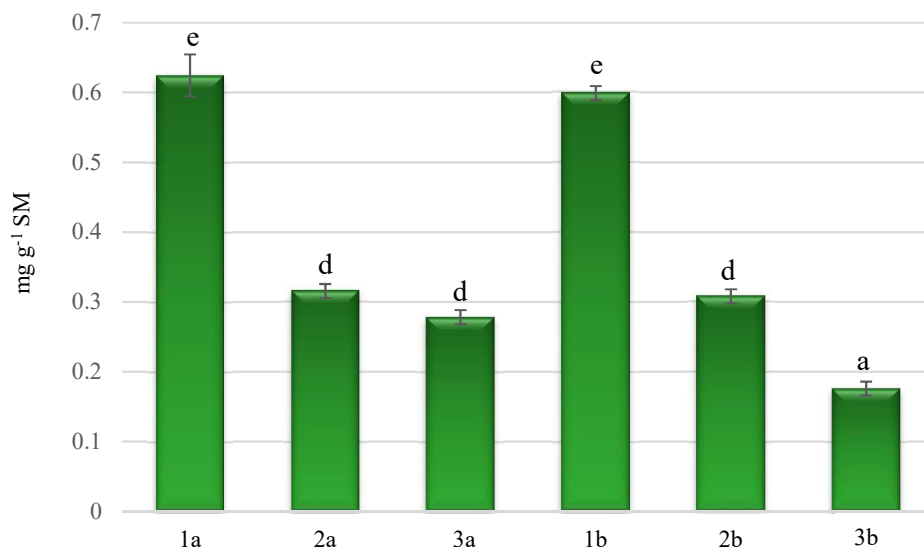
Табела 28. Концентрација хлорофила *a*, хлорофила *b*, однос хлорофила *a/b* и концентрација каротеноида (mg g⁻¹ SM) у свежим листовима клијанаца *Ocimum x citriodorum* при различитим концентрацијама нутријената и различитим изворима азота

	хлорофил <i>a</i>	хлорофил <i>b</i>	хлорофил <i>a/b</i>	каротеноиди
1a	0.443 ± 0.04c	0.182 ± 0.01d	2.46 ± 0.39c	0.086 ± 0.001e
2a	0.207 ± 0.01b	0.109 ± 0.003c	1.91 ± 0.07a	0.041 ± 0.001d
3a	0.174 ± 0.01a	0.104 ± 0.008c	1.69 ± 0.25b	0.039 ± 0.007d
1b	0.404 ± 0.01c	0.196 ± 0.002bd	2.07 ± 0.09c	0.071 ± 0.002ce
2b	0.219 ± 0.01e	0.088 ± 0.01ac	2.56 ± 0.5bc	0.045 ± 0.01bd
3b	0.119 ± 0.01da	0.057 ± 0.004a	2.095 ± 0.29b	0.021 ± 0.001a

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

Као и у случају концентрације хлорофила *a* и *b*, између ова два третмана није утврђена статистички значајна разлика у концентрацији каротеноида. У осталим третманима измерена је нижа концентрација каротеноида, а најниже вредности су добијене у клијанцима са третмана 3b, при чему је разлика статистички значајна у односу на остале третмане.

Вредности за количину укупног хлорофила представљене су на Графикону 30. Добијене вредности показале су да је најповољнији третман за примарну продуктивност овог генотипа 1a третман, тј. да је синтеза ове групе фотосинтетичких пигмената индукована у условима ниске концентрације минералних елемената. Додатно, висока концентрација укупног хлорофила је забележена и при третману 1b. Анализирањем укупне концентрације фотосинтетичких пигмената може се увидети да високе концентрације нутријената стресно делују на фундаментални метаболички процес синтезе пигмената, јер се са повећањем концентрације нутријената снижава концентрација хлорофила *a* и *b*.



Графикон 30. Количина укупног хлорофила у свежим листовима клијанаца *Ocimum x citriodorum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике ($p < 0.05$) између третмана на основу Tukey теста

За разлику од претходно испитиваних генотипова, у свежим листовима *Ocimum x citriodorum* није утврђена статистички значајна разлика у концентрацији укупних хлорофила у односу на тип азотне исхране. Међутим, како су најниже концентрације фотосинтетичких пигмената забележене при третману 3b, при чему је ова разлика статистички значајна у односу на остале третмане, може се закључити да је присуство амонијака додатни стресни фактор у условима високе концентрације нутријената.

4.3. Концентрација укупних солубилних протеина

Резултати добијени мерењем укупних солубилних протеина приказани су у Табели 29.

Измерена концентрација укупних солубилних протеина је у опсегу вредности од 2.40 до 6.15 mg g⁻¹ SM у изданцима и од 1.97 до 4.25 mg g⁻¹ SM у корену. Највећа концентрација протеина у изданцима измерена је при нитратним третманима са високом концентрацијом минералних материја (3а третман) и праћена је концентрацијом измереном при третману 3b (5.72 mg g⁻¹ SM). Између ове две концентрације не постоји статистички значајна разлика, али се ове вредности статистички значајно разликују у односу на остале третмане. У третманима са нитратима, као и у третманима са комбинацијом нитратних и амонијумових јона, уочен је исти тренд у синтези протеина – са повећањем концентрације минералних елемената, повећава се и концентрација протеина у изданцима.

Супротно изданцима, у корену се може уочити инхибиција у синтези ових градивних елемената при високим концентрацијама нутријената. Највише вредности забележене су при третманима 1a и 1b, при чему између ових вредности нису утврђене статистички значајне разлике. Са порастом концентрације минералних елемената опада концентрација укупних солубилних протеина. Статистички је значајно снижена концентрација протеина у коренима биљака гајених у третманима са високим концентрацијама нутријената уз присуство 20.6 mM NH₄NO₃ (при 3b третману концентрација протеина је 1.97 mg g⁻¹ SM) и значајно се разликује од осталих третмана.

Табела 29. Концентрација укупних солубилних протеина (mg g⁻¹ SM) у изданцима и корену клијанаца *Ocimum x citriodorum* у зависности од количине и типа нутријената

	изданак	корен
1a	3.70 ± 0.28bd	4.25 ± 0.08c
2a	3.77 ± 0.15b	3.37 ± 0.20ab
3a	6.15 ± 0.03a	3.50 ± 0.08ac
1b	2.40 ± 0.43e	3.95 ± 0.33ac
2b	3.75 ± 0.13d	3.74 ± 0.26ac
3b	5.72 ± 0.28ac	1.97 ± 0.03d

Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике (p < 0.05) између третмана на основу Tukey теста

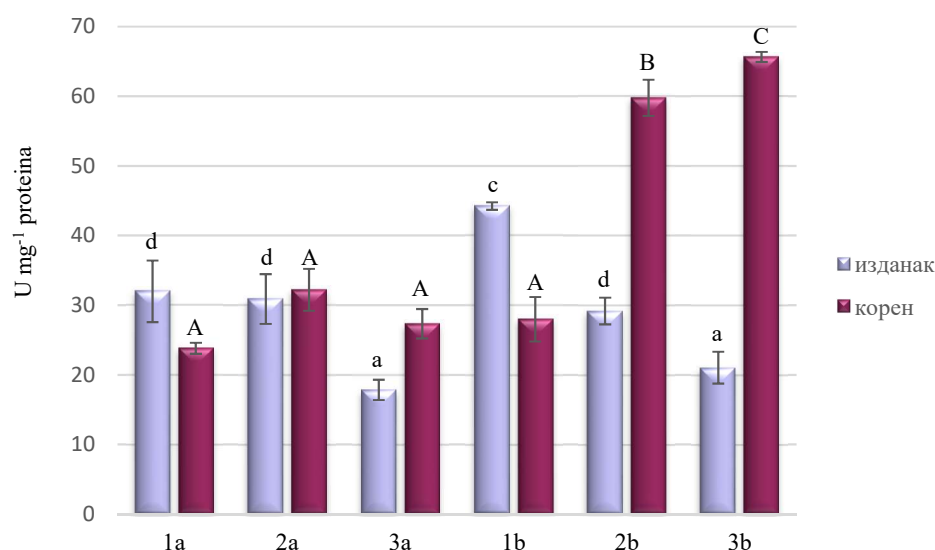
4.4. Активност ензимских компоненти одбрамбеног система

4.4.1. Активност супероксид дисмутазе

Резултати мерења активности супероксид дисмутазе у различитим органима клијанаца *Ocimum x citriodorum* приказани су на Графикону 31.

Анализирањем резултата може се увидети да је овај ензим показао различите нивое активности у зависности од испитиваног биљног органа, али и у зависности од коришћених третмана. У надземним органима клијанаца најниже вредности за активност супероксид дисмутазе забележене су при 3а и 3б третманима, при чему нису утврђене статистички значајне разлике између ових вредности. Додатно, када су у питању изданци, супероксид дисмутаза је најактивнија при најнижим концентрацијама нутријената, тј. при третманима 1б и 1а.

За коренску активност супероксид дисмутазе забележен је другачији тренд активности. При минималним концентрацијама нутријената, у третманима са нитратима као главним изворима азота, али и при комбинованој азотној исхрани, тј. при третману 1б, није утврђена статистички значајна разлика у активности овог ензима. Међутим, знатно је увећана активност при третманима 2б и 3б, односно са повећањем концентрације доступних нутријената, уз присуство амонијумових јона, активност супероксид дисмутазе се повећала у корену.

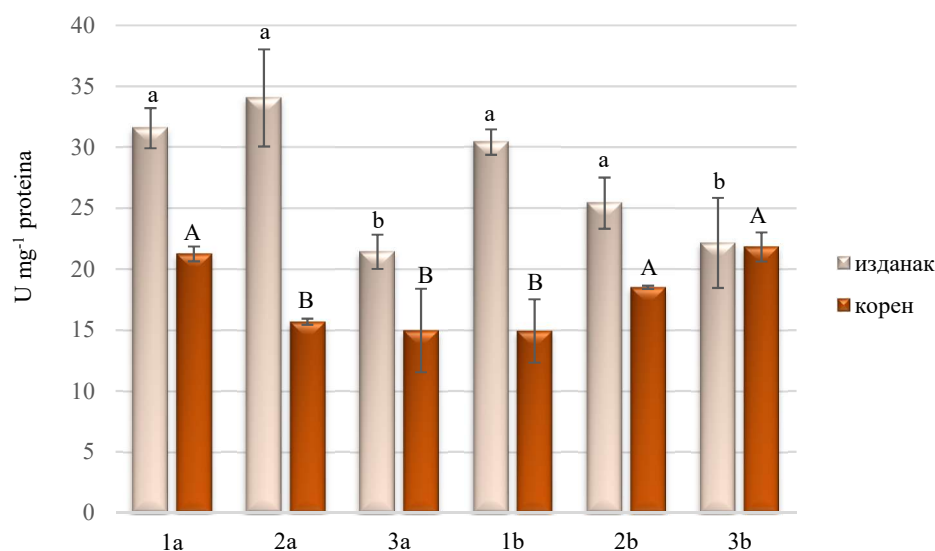


Графикон 31. Активност супероксид дисмутазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum x citriodorum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

4.4.2. Активност каталазе

На Графикону 32 приказани су резултати мерења активности каталазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum x citriodorum*.

Добијени резултати указују да је у надземним органима активност каталазе условљена концентрацијом доступних нутријената. Са порастом концентрације минералних елемената снижава се ниво активности каталазе, па је ензим најмање активан у третманима са високим концентрацијом нутријената. Додатно, не постоји статистички значајна разлика између резултата добијених применом 3а и 3б третмана, тј. између различитих форми азота. Међутим, ове вредности се статистички значајно разликују у поређењу са вредностима измереним у изданцима са других третмана. Такође, у изданцима је забележен виши ниво специфичне активности каталазе у односу на корен. У подземним органима клијанаца каталаза је показала другачији ниво активности у односу на форму примењеног азота. У нитратним третманима каталаза је најактивнија у случају ниске концентрације микро- и макронутријената (третман 3а), док је у случају комбиноване азотне исхране овај ензим најактивнији у присуству високе концентрације макро- и макронутријената (третман 3б). Додатно, *Ocimum x citriodorum* је једини од испитиваних генотипова чија је активност коренских каталаза, поред концентрацијске, показала и зависност у активности у односу на тип азотне исхране. Уједно, овај ензим је показао и другачији тренд активности у наведеним третманима.

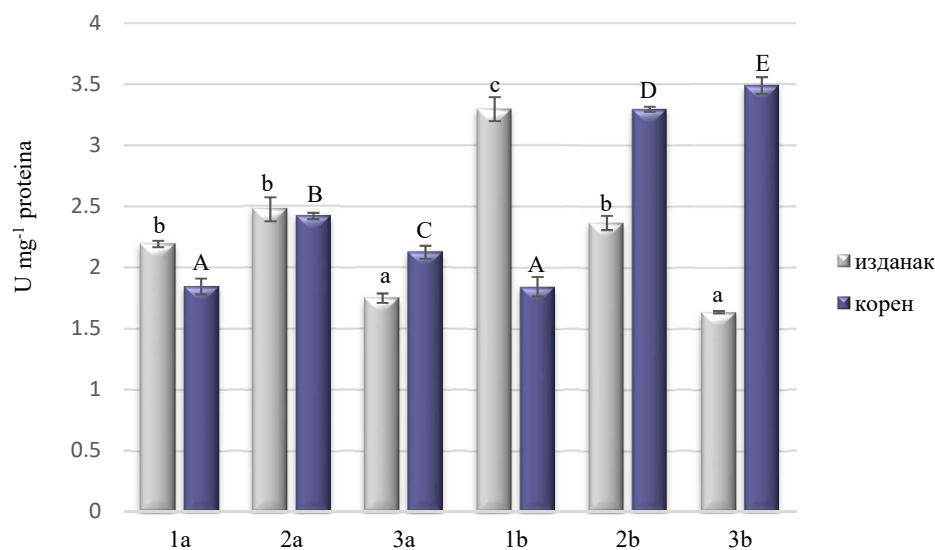


Графикон 32. Активност каталазе (U mg⁻¹ proteina) у изданцима и корену клијанаца *Ocimum x citriodorum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

4.4.3. Активност аскорбат пероксидазе

Резултати добијени мерењем активности аскорбат пероксидазе у изданцима и коренима клијанаца *Ocimum x citriodorum* приказани су на Графикону 33.

У изданцима клијанаца *Ocimum x citriodorum* гајених на нитратним третманима уочена је статистички значајно нижа активност ензима измерена при третману 3а у односу на третмане 1а и 2а. У присуству амонијумових јона активност ензима такође опада са порастом концентрације нутријената, при чему се у сваком од ових „b“ третмана резултати статистички значајно разликују. Додатно, најниже вредности овог ензима забележене су при 3а и 3b третманима и ове вредности се статистички значајно не разликују. Коренска активност аскорбат пероксидазе показује другачији тренд у активности у односу на активности овог ензима које су измерене у изданцима. Статистички значајна разлика у активности није утврђена само у случају ниских концентрација минералних елемената (1а и 1b третмани), без обзира на примењену форму азота, док се вредности за активности ензима при осталим примењеним третманима статистички значајно разликују. Највиши ниво активности аскорбат пероксидазе у подземним органима клијанаца *Ocimum x citriodorum* забележен је при третманима 2b и 3b и добијене вредности су више у односу на вредности измерене у изданцима.



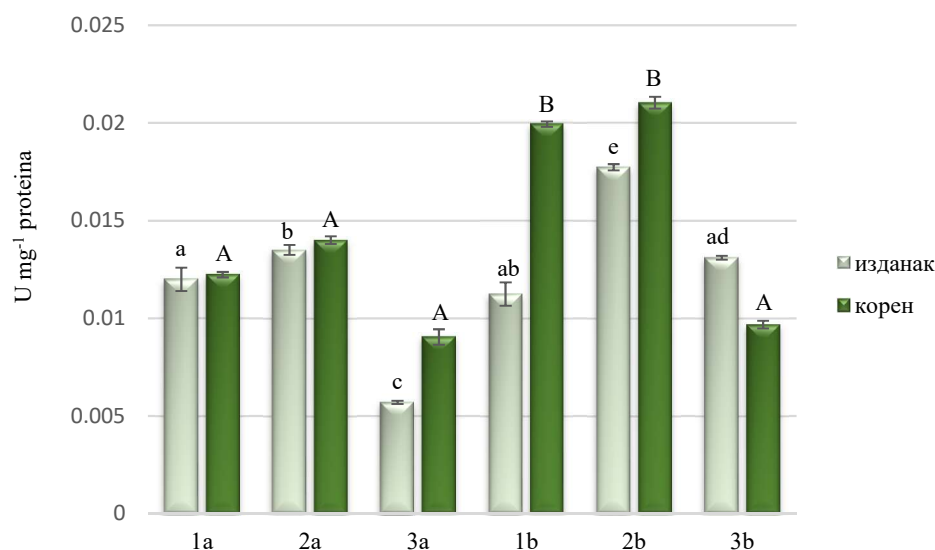
Графикон 33. Активност аскорбат пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum x citriodorum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста

4.4.4. Активност гвајакол пероксидазе

Способност протеинских екстраката клијанаца *Ocimum* x *citriodorum* да врше неутрализацију водоник-пероксида испитивана је и кроз мерење активности гвајакол пероксидазе и пирогалол пероксидазе. Резултати добијени мерењем активности гвајакол пероксидазе у изданцима и коренима клијанаца *Ocimum* x *citriodorum* приказани су на Графикону 34.

Добијени резултати указују на виши степен активности гвајакол пероксидазе у подземним у односу на надземне делове клијанаца. Додатно, активност наведеног ензима је условљена и концентрацијом нутријената, а у мањој мери и формом азота. Без обзира на коришћене изворе азота, гвајакол пероксидаза показује исти тренд активности у „а“ и „b“ третманима – највиша активност ензима измерена је при умереној концентрацији нутријената. Међутим, статистички значајно увећана активност у изданцима забележена је при 2a и 2b третманима, док је статистички значајан пад у активности измерен при третманима 3a и 3b.

Највише измерене вредности за гвајакол пероксидазну активност у корену показале су да је ензим активнији у третманима у којима је присутан NH_4NO_3 . Највише вредности су измерене при ниској и умереној амонијачној исхрани (1b и 2b третмани), при чему између ових третмана нису утврђене статистички значајне разлике, али разлике постоје у односу на остале коришћене третмане.

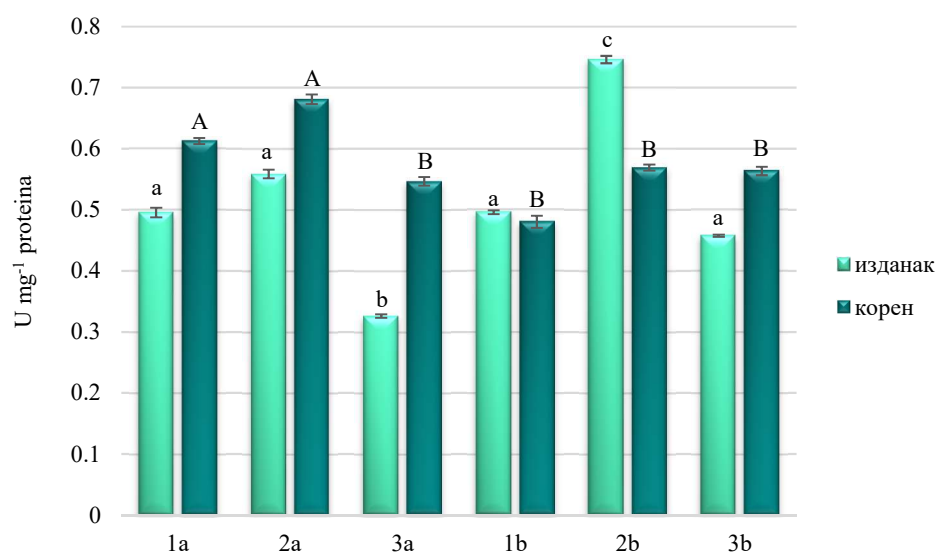


Графикон 34. Активност гвајакол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum* x *citriodorum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey testa

4.4.5. Активност пирогалол пероксидазе

Резултати добијени мерењем активности пирогалол пероксидазе у различитим деловима клијанаца *Ocimum x citriodorum* приказани су на Графикону 35.

Као и у случају гвајакол пероксидазе, показано је да је пирогалол пероксидаза активнија у корену у поређењу са изданцима. У изданцима, у третманима са нитратном формом азота, статистички значајан пад у активности евидентиран је при високој концентрацији нутријената (третман 3а) у односу на 2а и 1а третмане. Иако је ензим у овом типу третмана најактивнији при умереној исхрани (2а третман), измерене активности при третманима 1а и 2а се статистички значајно не разликују. У третманима који су поред нитрата садржали и амонијумове јоне, највећа активност пирогалол пероксидазе је измерена при 2b третману и статистички је значајно различита у односу на остале третмане. И у корену су, као и у изданцима, највише вредности ензима измерене при умереним концентрацијама нутријената посматрано у односу на тип азотне исхране. Међутим, статистички значајна разлика утврђена је једино при третманима 1а и 2а у односу на остале третмане. Највиши активност пирогалол пипероксидазе је при 2а третману и праћена је измереним вредностима у 1а третману. Између ових третмана није утврђена статистички значајна разлика, али се ове вредности значајно разликују у поређењу са вредностима за остале третмане.



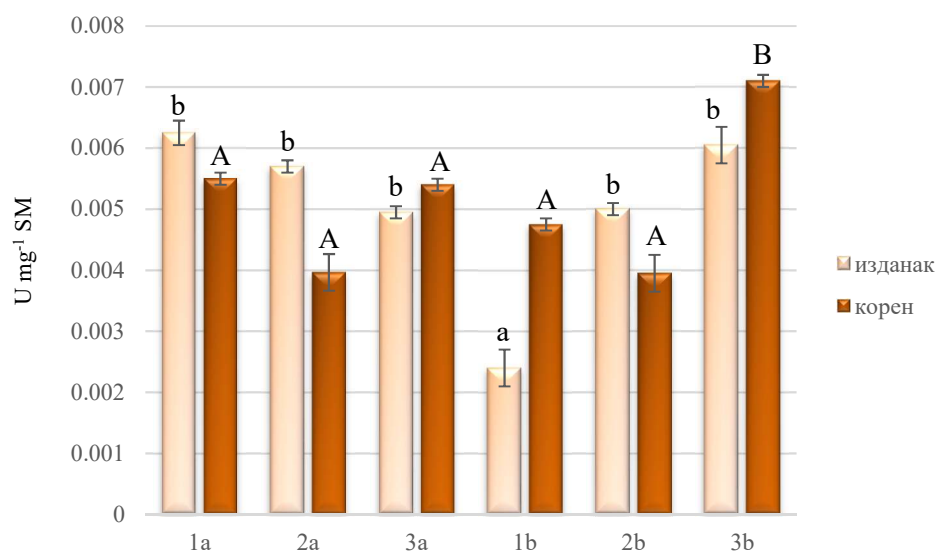
Графикон 35. Активност пирогалол пероксидазе у изданцима и корену клијанаца *Ocimum x citriodorum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey testa

4.5. Активност фенилаланин амонијум лиазае

Мерењем активности фенилаланин амонијум лиазае добијени су резултати који указују на разлике у активности овог ензима у органима клијанаца *Ocimum x citriodorum*, при чему су разлике условљене како концентрацијом нутријената, тако и типом азотне исхране и испитиваним органима клијанаца. Добијени резултати приказани су на Графикону 36.

У изданцима је овај ензим показао другачији тренд активности у односу на форму доступног азота. Међутим, утврђено је да је разлика у активности фенилаланин амонијум лиазае статистички значајна само у случају ниске концентрације минералних елемената и комбиноване форме азота (третман 1b) и у овом третману је активност наведеног ензима вишеструко нижа у односу на остале коришћене третмане.

Супротно изданцима, у подземним органима клијанаца *Ocimum x citriodorum* статистички значајна разлика у активности фенилаланин амонијум лиазае уочена је само у случају највише забележене активности овог ензима, и то у третману са високом концентрацијом нутријената и комбинованом формом азотне исхране (3b третман). Између осталих третмана (1a, 2a, 3a, 1b и 2b) нису утврђене статистички значајне разлике у активности коренске фенилаланин амонијум лиазае.



Графикон 36. Активност фенилаланин амонијум лиазае у изданцима и корену клијанаца *Ocimum x citriodorum* у зависности од количине и типа нутријената. Резултати су представљени као средња вредност три мерења $\pm$ стандардна грешка. Малим словима (a, b, c...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између изданака; великим словима (A, B, C...) означене су значајне разлике ($p < 0.05$) између коренова на основу Tukey теста.

4.6. Не-ензимске компоненте одбрамбеног система

4.6.1. Количина укупних фенолних једињења

Количина укупних фенолних једињења квантификована је у изданцима и коренима клијанаца *Ocimum x citriodorum*, а резултати мерења ове групе секундарних метаболита приказани су у Табели 30.

У надземним органима количина укупних фенолних једињења је у опсегу од 53.39 до 108.86 GAE mg⁻¹ SM, док је у подземним органима измерена количина укупних фенолних једињења у опсегу од 93.24 до 110.40 GAE mg⁻¹ SM. Највећа количина у изданцима забележена је при 3b третману (108.86 GAE mg⁻¹ SM) и ова вредност је статистички значајно различита у односу на вредности измерене при осталим третманима. Најнижа количина укупних фенолних једињења у изданцима измерена је при 1b третману (53.39 GAE mg⁻¹ SM), при чему између ове и вредности измерене при осталим третманима такође постоје статистички значајне разлике.

У подземним деловима клијанаца измерена је већа количина укупних фенолних једињења у односу на изданке и највећа количина (110.40 GAE mg⁻¹ SM) измерена је при третману 1b и праћена је вредностима добијеним за корене са третмана 2a (110.03 GAE mg⁻¹ SM), при чему нису утврђене статистички значајне разлике у вредностима између ова два третмана. Најнижа вредност евидентирана је у коренима гајеним при ниским концентрацијама нутријената са нитратима као главним извором азота (93.24 GAE mg⁻¹ SM при третману 1a).

Табела 30. Количина укупних фенолних једињења, количина флавоноида и укупна антиоксидативна активност у изданцима и корену клијанаца *Ocimum x citriodorum* у зависности од количине и типа нутријената

третман	количина укупних фенолних једињења (GAE mg ⁻¹ SM)		количина флавоноида (RUE mg ⁻¹ SM)		укупна антиоксидативна активност (IC ₅₀ , µg mL ⁻¹)	
	изданак	корен	Изданак	корен	изданак	корен
1a	64.28 ± 0.86b	93.24 ± 0.46b	18.84 ± 0.21b	7.89 ± 0.24a	80.23 ± 0.40b	40.15 ± 0.72a
2a	61.22 ± 0.54b	110.03 ± 2.02a	13.29 ± 0.29a	7.11 ± 0.36b	92.03 ± 0.30b	30.79 ± 0.53a
3a	78.58 ± 1.41a	97.74 ± 0.43ab	13.26 ± 0.21a	7.19 ± 0.17ab	55.77 ± 0.93b	48.39 ± 0.48b
1b	53.39 ± 0.88e	110.40 ± 1.18a	19.13 ± 0.27b	7.23 ± 0.27ab	85.24 ± 0.91b	32.99 ± 0.71a
2b	79.29 ± 1.10ad	98.79 ± 0.38ab	17.44 ± 0.12d	7.37 ± 0.29ab	55.34 ± 0.96b	30.50 ± 0.87a
3b	108.86 ± 1.23c	108.47 ± 1.07a	12.62 ± 0.12c	7.14 ± 0.17ab	43.83 ± 0.36a	33.21 ± 1.05a

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике (p < 0.05) између третмана на основу Tukey теста

4.6.2. Количина флавоноида

Количина флавоноида је код *Ocimum x citriodorum* квантификована у изданцима и у корену. Резултати мерења количине флавоноида, изражене кроз еквивалент рутина, приказани су у Табели 30.

У надземним деловима клијанаца измерена количина флавоноида је у опсегу вредности од 12.62 до 19.13 RUE mg⁻¹ SM и приметно је да је ова група фенолних једињења показала дозно-зависни тренд у синтези, тј. са смањењем концентрације доступних нутријата повећава се количина ових метаболита. Иако је највећа количина флавоноида измерена при третману 1b (19.13 RUE mg⁻¹ SM), није утврђена статистички значајна разлика између третмана 1b и 1a (измерена количина флавоноида при третману 1a је 18.84 RUE mg⁻¹ SM). Статистички значајно нижа количина метаболита измерена је при третману 3b (12.62 RUE mg⁻¹ SM).

У корену је количина флавоноида у опсегу вредности од 7.11 до 7.89 RUE mg⁻¹ SM, при чему је најнижа количина измерена при 2a, а највиша при 1a третману. Ово су уједно и једини третмани између којих је утврђена статистички значајна разлика у концентрацији ове групе фенолних једињења. Као и у случају осталих испитиваних генотипова, при наведеним условима количина флавоноида је и код генотипа *Ocimum x citriodorum* условљена, пре свега, концентрацијом микро- и макронутријената, док форма азота није имала значајан утицај.

4.7. Укупна антиоксидативна активност

Резултати добијени мерењем укупне антиоксидативне активности различитих делова клијанаца *Ocimum x citriodorum* приказани су у Табели 30.

У изданцима су добијене IC₅₀ вредности у опсегу од 92.03 до 43.83 µg mL⁻¹. Највећа способност неутрализације DPPH радикала добијена је за изданке гајене на 3b третману и ова вредност се статистички значајно разликује у поређењу са вредностима измереним при осталим третманима. Имеђу вредности измерених у екстрактима изданака гајених на осталим третманима нису утврђене статистички значајне разлике у укупној антиоксидативној активности.

У подземни органима клијанаца *Ocimum x citriodorum* генерално је утврђена боља способност неутрализације DPPH радикала, при чему су измерене IC₅₀ вредности у опсегу од 48.39 до 30.50 µg mL⁻¹. Највећу укупну антиоксидативну активност показали су екстракти коренова клијанаца гајених на 2a третману, међутим и за корене клијанаца гајених на свим коришћеним

третманима може се констатовати висока способност неутрализације слободних радикала и висока укупна антиоксидативна активност. Статистички значајна разлика утврђена је само у случају коренова *Ocimum x citriodorum* гајених на третману 3а.

4.8. Концентрација рузмариנסке и кофеинске киселине

Резултати добијени квантификацијом одабраних фенолних киселина HPLC методом у метанолним екстрактима изданака и корена *Ocimum x citriodorum* приказани су у Табели 31.

Мерењем концентрације рузмариנסке киселине у изданцима добијене су вредности у опсегу од 13.0 до 32.5 mg g⁻¹. Највећа концентрација ове киселине измерена је у екстрактима изданака гајених на нитратном третману са умереном концентрацијом нутријената (третман 2а), али су значајне вредности измерене при третманима 3а (28.5 mg g⁻¹) и 3б (25.1 mg g⁻¹). Између ових третмана нису утврђене статистички значајне разлике. Најнижа концентрација рузмариנסке киселине је измерена у изданцима при третману 1б и праћена је вредностима добијеним при третману 1а (19.7 mg g⁻¹), без статистички значајних разлика између наведених вредности.

У корену је измерена већа концентрација рузмариנסке киселине у поређењу са изданцима (у опсегу вредности од 20.3 до 39.2 mg g⁻¹). Највећа количина ове киселине добијена је у коренима биљака са третмана 1б, а значајне концентрације су добијене и у коренима са нитратних третмана („а“ третмани). Између вредности са ових третмана нису утврђене статистички значајне разлике. Најнижа концентрација забележена је при третману 1а и праћена је вредношћу измереном у коренима са третмана 2б (22.8 mg g⁻¹) и између ових вредности нема статистички значајних разлика.

Табела 31. Концентрација рузмариנסке и кофеинске киселине у изданцима и корену клијанаца *Ocimum x citriodorum* у зависности од количине и типа нутријената

третман	рузмаринска киселина (mg g ⁻¹)		кофеинска киселина (mg g ⁻¹)	
	изданак	корен	изданак	корен
1а	19.7 ± 1.0b	28.7 ± 1.5b	0.248 ± 0.02b	0.183 ± 0.01a
2а	32.5 ± 1.7a	29.6 ± 1.5b	0.301 ± 0.02c	0.182 ± 0.01a
3а	28.5 ± 1.5a	28.2 ± 1.5b	0.256 ± 0.02b	0.289 ± 0.02b
1б	13.0 ± 0.7b	39.2 ± 2.0a	0.116 ± 0.01a	0.198 ± 0.01a
2б	20.1 ± 1.0b	22.8 ± 1.2c	0.135 ± 0.01a	0.121 ± 0.01a
3б	25.1 ± 1.3a	20.3 ± 1.1c	0.216 ± 0.01b	0.112 ± 0.01a

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± стандардна грешка. Различита слова означавају значајне разлике (p < 0.05) између третмана на основу Tukey теста

Мерењем концентрације кофеинске киселине у изданицима и корену клијанаца *Ocimum x citriodorum* добијене су вредности приказане у Табели 31.

Измерена концентрација ове фенолне киселине у изданицима је у опсегу вредности од 0.116 до 0.301 mg g⁻¹. Највећа концентрација измерена је у изданицима са 2a третмана и између ове вредности и вредности које су измерене при осталим третманима утврђена је и статистички значајна разлика. Најнижа вредност кофеинске киселине измерена је у изданицима са 1b третмана и праћена је вредностима измереним при третману 2b (0.135 mg g⁻¹), при чему није утврђена статистички значајна разлика између ових третмана.

Када су у питању корени клијанаца, измерене концентрације кофеинске киселине су у опсегу вредности од 0.112 до 0.289 mg g⁻¹. Највећа концентрација кофеинске киселине забележена је код екстраката корена гајених у 3a третману и између ове вредности и вредности измерене при осталим третманима утврђена је и статистички значајна разлика. Најниже вредности евидентиране су у коренима са 3b (0.112 mg g⁻¹) и 2b третмана (0.121 mg g⁻¹), при чему се ове две вредности статистички значајно не разликују.

ДИСКУСИЈА

Научна достигнућа и њихова примена у области биљне физиологије и биохемије постижу се не само усавршавањем прецизности доступних аналитичких метода, већ и модернизацијом приступа у креирању нових модел-система који омогућавају изучавање комплексних процеса који се дешавају у интактним биљкама. Међу таквим системима који се активно примењују у биљној физиологији и биохемији јесу и *in vitro* култивација биљних ћелија, ткива и органа (Kuzovkina и Vdovitchenko, 2011).

Данас се *in vitro* култура биљака успоставља рутински под асептичним условима и последњих година је интензивирана, пре свега због ефикасне производње секундарних метаболита биљака. Међутим, потешкоће и неуспеси који настају у таквим процесима углавном су последица недовољно разјашњених путева синтезе секундарних метаболита (Karuppusamy, 2009). Предности развијеног *in vitro* система у односу на плантажни начин гајења биљака огледају се, пре свега, у коришћењу асептичних медијума јасно дефинисаног састава, без потреба за додатним нутритивним суплементима, а уз мање радне снаге и физичког простора. Све ове предности омогућавају и лакшу обраду материјала уз ефикасан скрининг добијеног биљног материјала. Додатно, у поређењу са хидропоничним културама, *in vitro* систем у знатно мањој мери захтева употребу специјализованих инструмената, техничких вештина, рада и енергије (Srivastava и сар., 2014).

До данас постоји велики број литературних података који се односе на различите облике *in vitro* културе представника фамилије Lamiaceae. Међутим, у поређењу са осталим представницима ове фамилије, ипак је недовољан број истраживања извршен у *in vitro* условима са представницима рода *Ocimum* као објектима истраживања. Експерименталним радом спроведеним у овом истраживању успешно је успостављена *in vitro* култура клијанаца четири различита генотипа босиљка, а добијени резултати, поред разјашњавања интраспецијских разлика у физиолошким и биохемијским одговорима босиљка на нутритивни стрес, омогућавају и јасно дефинисање нутритивних захтева појединачних генотипова уз минималне стресне одговоре. Додатно, јасно дефинисан састав медијума омогућава успешно коришћење културе клијанаца као једног од начина почетне културе експаната помоћу којих се даље могу успоставити и неки други облици *in vitro* културе босиљка, а уз минималне додатне губитке средстава и материјала.

Салинитет је један од најинтензивнијих абиотичких фактора са деструктивним ефектом на морфолошке, биохемијске и физиолошке процесе код биљака (Gengmao и сар., 2015; Hamada AbdElgawad и сар., 2016). Познато је да ниске концентрације соли представљају блажи облик стреса за биљке и да у присуству ниских концентрација соли метаболизам биљака функционише углавном уз благе промене, док високе концентрације соли представљају интензивнији стрес који може довести до значајних метаболичких оштећења и инхибиције растења и развића (Vujičić, 2016). Ефекат који присуство соли (у мањој или већој концентрацији) изазива на растење и развиће биљака врло је сличан, са једне стране, нутритивној депривацији, тј. недостатку нутријената, али са друге стране и вишку нутријената. Присуство натријум хлорида у подлози на којој се биљка развија директно утиче на растење и развиће биљке због отежане апсорпције хранљивих материја, па је смањено растење праћено такозваним „гладовањем“ биљке и нарушавањем апсорпције минералних материја (Dajić, 2006). Са друге стране, механизам којим соли инхибирају растење и развиће биљака у вези је и са токсичним дејством вишка соли у подлози – ефекат који производи и висока концентрација нутријената у медијуму (Polesskaya и сар., 2006). Имајући у виду ефекте које соли могу остварити на растење и развиће биљака, први део истраживања подразумевао је праћење пролонгираног деловања различитих концентрација натријум хлорида у *in vitro* условима и евидентирање ефеката овог стресора на просторне и временске промене клијанаца. Спроведени експерименти имали су за циљ евалуацију *in vitro* културе клијанаца као потенцијалног система за праћење физиолошких и биохемијских промена различитих генотипова босиљка.

Растење је код биљака у директној вези са интензивним деобама ћелија меристемског ткива. Редуковано растење као примарни одговор на салинизацију подлоге у вези је, пре свега, са транспортом натријумових јона до апикалних меристема стабла (Lazof и Bernstein., 1999; Dajić, 2006). Тренд инхибираног растења и развића уочен је и у случају *in vitro* гајених клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum*, при чему је највећа инхибиција забележена при највећој концентрацији овог стресног агенса. Редукована дужина и редукована свежа маса изданака и корена клијанаца овог генотипа босиљка вероватно су последица отежаног усвајања макро- и микронутријената из медијума, па самим тим и нарушавања метаболичких и биохемијских процеса повезаних са растењем и развићем. Резултати су у складу са претходним истраживањима спроведеним на различитим сортама босиљка (Tarchoune и сар., 2012a; Bekhradi и сар., 2015; Shao и сар., 2015). Редукција дужине корена тек након 28 дана и стимулација у издуживању корена током прве три недеље, уз истовремену редукцију дужине изданака, указују да се адсорбовани јони дистрибуирају на органоспецифичан начин, што је потврђено и од стране Srinienг и сар. (2015) који су испитивали

развој клијанаца различитих варијетета парадајза у *in vitro* условима при концентрацијама натријум-хлорида од 0, 5, 10, 25 и 50 mM.

Реактивне врсте кисеоника генеришу се у биљним ћелијама као неизбежни продукти физиолошких процеса код биљака, али и услед неповољних услова који нарушавају хомеостазу биљака (Karuppanapandian и сар., 2011; Jakovljević и сар., 2017a). Салинитет такође доводи до формирања реактивних врста кисеоника у биљним ћелијама, што даље резултира активирањем ензимских и не-ензимских антиоксиданаса. Повећана активност компоненти антиоксидативне заштите као реакција на стрес изазван солима запажена је у великом броју студија и указује на значајну улогу ових одбрамбених компоненти у условима стреса изазваног солима. Иако до сада нису идентификоване антиоксидативне компоненте специфично везане за салинитет, за овај тип стреса везују се специфични физиолошки и биохемијски механизми (Hamada Abdelgawad и сар., 2016). Повећана активност, али и усклађеност у активностима антиоксидативних ензима, пре свега супероксид дисмутаза, каталаза и пероксидаза, данас се, генерално, сматрају адаптивним стратегијама врста толерантних на стрес изазван солима (Jamieson, 1998; Dajić, 2006; Jia и сар., 2015).

При истраживањима физиолошких одговора клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* на пролонгирани сони стрес забележено је да је активност супероксид дисмутаза индукована првих недеља *in vitro* растења и развића (максималне активности друге и треће недеље), а констатован је пад активности на крају експеримента. Може се закључити да је ензимски систем супероксид дисмутаза у младим биљкама (прва недеља развоја) недовољно развијен да одговори на услове стреса у односу на исти систем друге и треће недеље растења и развића. Последици пад у активности наступа или услед развоја и активности других ензима који преузимају функцију уклањања слободних радикала, или услед развоја не-ензимских компоненти (Srinieng и сар., 2015).

Резултати добијени мерењем каталазне активности указују на значајну улогу овог ензима у уклањању водоник-пероксида из изданака у раним фазама развоја и при првом контакту клијанаца генотипа *Ocimum basilicum* var. *minimum* са водоник-пероксидом, при чему овај ензим показује вишеструко ниже активности у корену, где је индукован тек у каснијим фазама развоја. Значајан пад у активности каталазе у изданима 21. дана може бити последица стварања неповољних услова за активност овог ензима или нарушене синтезе протеина услед отежаног усвајања јона из медијума. Последици пораст у активности каталазе наступа вероватно услед аклиматизације младих клијанаца и *de novo* синтезе протеина и самог ензима.

Главни продукт активности супероксид дисмутаза – токсични водоник-пероксид, поред каталазе, може бити уклоњен и ензимима из групе пероксидаза. У овом експерименталном делу

испитивани су гвајакол пероксидаза и пирогалол пероксидаза. Иако активност наведених ензима у појединим мерењима опада, примећен је исти тренд у активности: у току развоја клијанаца, активност гвајакол пероксидазе и пирогалол пероксидазе расте, при чему је гвајакол пероксидаза активнија у корену. Доказано је да повећање активности антиоксидативних ензима у условима стреса изазваног солима може повећати толерантност биљака на овај негативни фактор (de Azevedo Neto и сар., 2006; Valderrama и сар., 2006; Aghaei и сар., 2009). Повећана активност пероксидаза у клијанцима *Ocimum basilicum* var. *minimum* током *in vitro* развоја под стресним условима може заштитити овај генотип од оксидационог оштећења. Пад у активности супероксид дисмутазе 28. дана након претходно уоченог повећања активности, заједно са прогресивним порастом активности пероксидаза, сугеришу да SOD-POX системи могу представљати круцијални протективни механизам за *Ocimum basilicum* var. *minimum* у условима стреса изазваног солима. Према Вајраи и Srivastava (2015) активност супероксид дисмутазе је индукована у стресним условима са циљем конверзије супероксид-анјон радикала до водоник-пероксида, који уклањају каталазе и пероксидазе. Међутим, активност супероксид дисмутазе је индукована само до одређеног нивоа, а последични пад у активности супероксид дисмутазе је последица немогућности каталаза и супероксид дисмутаза да уклоне настали водоник-пероксид. При овим процесима антиоксидативни систем заштите је у дисбалансу, што даље резултује и поремећајем растења и развића.

Пирогалол пероксидазе и гвајакол пероксидазе могу бити лоциране у цитосолу, ћелијском зиду, вакуолама и ванћелијском простору, а повећана активност ове групе ензима може бити у вези и са њиховим појачаним отпуштањем из ћелијских зидова (Verma и Dubej, 2003), али и интензивираниог секундарног метаболизма, пошто ове пероксидазе као доноре електрона за уклањање водоник-пероксида користе ароматична једињења (Şen, 2012). Додатно, ензими класе III пероксидаза су повезани и са растењем, развићем и лигнификацијом (Hediye Sekmen и сар., 2007), па се може закључити да ће POX систем бити значајнија компонента одбрамбеног система у развијенијим клијанцима. До сада је вишеструко потврђена есенцијална улога усклађених координација активности CAT и POX са SOD (Liang и сар., 2003; de Azevedo Neto и сар., 2006; Hediye Sekmen и сар., 2007; Jbir-Koubaa и сар., 2015; Rajaeian и Ehsanpour, 2015).

Tarchuone и сар., (2010, 2012) су испитивали промене у антиоксидативном систему *Ocimum basilicum* (генотипови Genovese и Fine) у присуству различитих натријумових соли (25 mM Na₂SO₄ и 50 mM NaCl). Иако испитивања нису извршена *in vitro*, ипак је сугерисано од стране аутора да су, у случају босилка, различити механизми антиоксидативне заштите укључени у детоксификацију водоник-пероксида, као и да је кооперација компоненти антиоксидативног система босилка изузетно значајна у превазилажењу стресних услова.

Промене уочене током првих недеља *in vitro* развоја *Ocimum basilicum* var. *minimum* под стресом изазваним солима, чак и при ниским концентрацијама, показују да у клијанцима постоји софистицирани механизам антиоксидативне заштите којим се прилагођава активност одговарајућих ензима у циљу очувања хомеостазе. Каталаза, гвајакол пероксидаза и пирогалол пероксидаза, у координацији са супероксид дисмутазом, успешно штите клијанце од оксидативног оштећења. Под наведеним *in vitro* условима активност ових ензима је различита у корену у односу на изданке. Додатно, анализирањем каталазне активности, може се закључити да антиоксидативни ензими могу бити регенерисани, тј. *de novo* синтетисани.

На основу свега наведеног закључено је да *in vitro* култура клијанаца може бити коришћена као модел-систем у оквиру ког се могу индуковати промене од стране различитих агенаса, а под контролисаним условима, и пратити морфолошки, физиолошки и биохемијски одговори током раног растења и развића различитих генотипова *Ocimum basilicum*.

За нормално одвијање физиолошких процеса код биљака доступност макро- и микронутријената је есенцијална, нарочито током раних фаза растења и развића (Kalaji и сар., 2014). Као главна компонента аминокиселина и протеина, али и као регулатор ензимских активности, азот је есенцијални макронутријент који значајно утиче и на морфолошке и на физиолошке карактеристике код биљака (Hachiya и Sakakibara, 2016; Martínez и сар., 2017). Овај суштински елемент је доступан у различитим формама, али, међу њима, нитратни анјон и амонијумов катјон су примарни извори азота код биљака. Ови јони утичу на продуктивност, квалитет и састав биљака, при чему се на биљкама могу развити и видљиве промене уколико се развијају на подлогама са вишком или дефицитом ових јона (Polesskaya и сар., 2006; Repčák и сар., 2014; Sajko и сар., 2017). За већину биљних врста нитратни јони су главни облици искоришћавања азота (Polesskaya и сар. 2004). Међутим, познато је да се амонијум може знатно ефикасније метаболисати јер не захтева претходну редукцију, па се зато данас у производњи азотних ђубрива велики значај придаје управо амонијачној исхрани (Jakovljević и сар., 2017b). Ипак, ова форма додатне исхране се показала стресном за многе економски значајне биљне врсте и сматра се једним од најзначајнијих стресних агенаса који могу довести до оштећења култивисаних биљака и формирања такозваног „амонијачног синдрома“ (Domínguez-Valdivia и сар., 2008).

Један од основних проблема на који се наилази у току процеса култивације је контролисање услова минералне исхране, што даље резултира падом у приносу, али и саставу биоактивних компоненти, па уколико се јасно не дефинишу услови минералне исхране, нутритивни стрес може довести до значајних губитака (da Silva и сар., 2017). Герминација и развој клијанаца представљају

критичне фазе, можда и најкритичније и најрањивије фазе у развоју сваке биљке. Током ових фаза је евидентно да је ткиво које иницира раст и диференцијацију ембриона и зигота веома осетљиво на факторе спољашње средине (Chacón и сар., 2013). Превенција стресних услова спољашње средине током сезоне растења и развића битан је аспект у производњи економски значајних биљних врста, нарочито када су врсте у периоду клијања, а потом и развића младих клијанаца (Balabusta и сар., 2016). Успешна производња економски значајних биљних врста у многоне зависи од клијања њихових семена. Комерцијална производња биљака на отвореним засадима и клијање у рано пролеће имају за последицу и повећану концентрацију соли у земљишту током наведеног периода. Зато се код појединих врста процес клијања одлаже до постизања оптималних услова у спољашњој средини (Ungar, 1995; Fernandez и сар., 2015).

На основу резултата добијених у овом експерименталном раду може се закључити да семена испитиваних генотипова босилка показују значајне разлике у карактеристикама клијања у зависности од доступности нутријената, али и примењене форме азота. Међу тестираним генотиповима семена хибридног генотипа *Ocimum* x *citriodorum* показала су највећи проценат клијања (скоро 98%) и то при минималној концентрацији нутријената. И семена *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal су у највећем проценту клијала при минималној концентрацији нутријената, за разлику од *Ocimum basilicum* var. *minimum* и *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese, чија су семена клијала у највећем проценту у третманима са високом концентрацијом нутријената, али на нитратним медијумима. Међутим, укупни проценат проклијалих семена само рефлектује способност семена да клијају, при чему не указује на брзину, синхронизованост и стопу клијања, тј. на виталне факторе који морају бити укључени у карактеризацију семена, не само са хортикултуралне и агрономске тачке, већ због дефинисања физиолошких, технолошких и еколошких карактеристика (Al-Mudaris, 1998; Rana и Santana, 2006; Mavi и сар., 2010; Fernandez и сар., 2015).

Средње време клијања (MTG) може се дефинисати као дужина *lag* фазе клијања од почетка имбибиције до пробијања радикуле и значајан је индикатор емергенције (Mavi и сар., 2010). Како MTG представља средње време од иницирања клијања до његовог завршетка, ниже вредности MTG репрезентују брже клијање (Fernandez и сар., 2015). Према брзини клијања, тестирани генотипови заузимају следећи редослед: *Ocimum basilicum* var. *minimum* < *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal < *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese < *Ocimum* x *citriodorum*, при чему је средње време клијања семена сваког од генотипова знатно дуже у присуству NH_4NO_3 . Супротно средњем времену клијања, стопа клијања, тј. брзина клијања семена (RG) са већим вредностима означава бржу герминацију (Fernandez и сар., 2015). Према овом параметру уочава се следећи

редослед: *Ocimum basilicum* var. *minimum* < *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal < *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese < *Ocimum* x *citriodorum*. Као и у случају времена клијања, брзина клијања је генерално нижа када семена клијају у присуству NH_4NO_3 . Коефицијент униформности у клијању семена указује на варијабилност међу семенима у односу на средње време клијања узорак (Ranal и Santana, 2006). Забележен је исти тренд у униформности клијања као и у случају времена и брзине клијања, тј. следећи редослед: *Ocimum basilicum* var. *minimum* < *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal < *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese < *Ocimum* x *citriodorum*.

Без обзира на захтеве које појединачни генотипови имају у погледу концентрације нутријената, а у вези са постизањем најбољих карактеристика клијања, показано је да када су семена босилка у контакту са NH_4NO_3 процес герминације је под значајно негативним утицајем. У присуству амонијумових јона почетак клијања је одложен, брзина клијања је успорена и стопа клијања редукована, па се може закључити да је целокупна способност семена да клијају умањена. Овакви негативни ефекти присуства амонијумових јона потврђени су од стране Pèrez-Fernàndez и сар., (2006). Аутори, осим индикација о интра- и интерспецијским разликама у клијању семена, наговештавају и значајно одлагање процеса клијања услед третмана са NH_4NO_3 . Позитивни ефекти KNO_3 на процесе клијања према Espanany и сар. (2016) огледају се у утицају KNO_3 на пермеабилитет ћелијских мембрана и активирању ензима укључених у синтезу протеина и метаболизам угљених хидрата. Варијабилност у брзини, динамици и униформности клијања семена босилка (означених као зелена и љубичаста сорта) показани су од стране Noorhosseini и сар. (2017), при чему аутори истичу значај оваквих истраживања у циљу побољшања услова култивације и приноса комерцијалних плантажа.

Фотосинтеза је фундаментални физиолошки процес и неадекватна количина нутријената директно утиче на фотосинтетички апарат, пре свега кроз биосинтезу и функционисање кључних фотосинтетичких компоненти (Kalaji и сар. 2014). Како су главни носиоци фотосинтетичког процеса фотосинтетички пигменти, стресни фактор који негативно утиче на синтезу фотосинтетичких пигмената може редуковати фотосинтетички капацитет (Ashraf и Harris, 2013; Vacha и сар., 2017), па губитак фотосинтетичких пигмената директно указује на редукцију фотосинтезе (Jakovljević и сар., 2017b). У случају *Ocimum basilicum* var. *minimum* вишеструко већа фотосинтетска активност евидентирана је при високој концентрацији нутријената, а смањена концентрација фотосинтетичких пигмената при нижим концентрацијама минералних елемената сведочи о условима нутритивне депривације и редукције фотосинтезе услед недостатка хранљивих материја. Супротно овом генотипу, виша концентрација фотосинтетичких пигмената, као и бољи однос хлорофила *a* и *b* код

генотипова *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal и *Ocimum* x *citriodorum* забележени су при ниским концентрацијама нутријената, а редукција фотосинтетске активности при великој количини хранљивих материја указује на услове стреса изазване вишком нутријената. Додатно, у оба случаја се боља фотосинтетичка активност постиже при нитратној исхрани. *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese максималне фотосинтетичке способности остварује у условима умерене или смањене концентрације нутријената, а висок садржај хранљивих материја у подлози изазива смањену концентрацију фотосинтетичких компоненти. Такође се, и за овај генотип, предност даје нитратној исхрани. Услови стреса, било услед недостатка или вишка нутријената, додатно су интензивирани амонијачном исхраном. Познато је да пад у концентрацији пигмената може бити условљен или недостатком есенцијалних елемената или инхибицијом усвајања нутријената услед акумулираних јона у подлози (Ali и сар., 2004; Sriniegn и сар., 2015), а пад фотосинтетичког капацитета босилка услед различитих стресних услова је потврђен и ранијим истраживањима (Vågen и сар., 2003; Heidari и Golpayegani, 2012; Tarchoune и сар., 2012b). Присуство пигмената чак и при највећем интензитету стреса указује на могућност обнављања фотосинтетичког апарата и даље несметано обављање процеса фотосинтезе након накнадно успостављених оптималних услова за растење и развиће (Vujičić, 2016).

Поред митохондрија и пероксизома, фотосинтетички апарат је главни ендогени извор реактивних врста кисеоника чак и током усклађених физиолошких процеса (Hussain и сар., 2016), при чему дисипација енергије током фотосинтезе може активирати генетички програмиране путеве који доводе до ћелијске смрти (Foyer и Shigeoka, 2011). Каротеноиди имају у фотосинтези функцију помоћних пигмената који фотосинтетички апарат ослобађају вишка енергије пре него она оштети биљне ћелије (Shumskaya и Wurtzel, 2013) и спречавају генерисање синглет-кисеоника током фотосинтезе (Polesskaya и сар., 2006). Осим што је концентрација ове групе пигмената у корелацији са концентрацијом хлорофила у нитратним медијумима, приметно је да је синтеза каротеноида интензивирана у присуству NH_4NO_3 . Овакви резултати указују на интензивније формирање реактивних врста кисеоника у присуству амонијумових јона (Polesskaya и сар., 2004). Најнижа концентрација каротеноида забележена је у листовима *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal, највероватније због присуства пигмената из групе антоцијанина у мезофилу листа овог љубичастог босилка, за које је показано да штите фотосинтетички апарат листа када је синтеза хлорофила нарушена (Landi и сар., 2014).

Реакције биљака на услове стреса су веома сложене и укључују многе врсте физиолошких и биохемијских одговора који су иницирани од стране биљака у циљу избегавања, превазилажења или неутрализације штетних ефеката. Толеранција или осетљивост према одређеном стресном стању

зависи од генетичких и биохемијских чиниоца саме врсте. Биљке нису у стању да експримирају свој целокупни генетички потенцијал када су у условима стреса, јер различити спољашњи чиниоци проузрокују значајне модификације у генској експресији. Такве модификације могу довести до алтерације у активности многих ензима, али и синтезе новог сета протеина који су специфични за одређени тип стреса (Sharma и Dubey, 2016). Протеини, као функционално изузетно разноврсни макромолекули, учествују у ћелијској сигнализацији, регулацији, катализи, интрацелуларном и интерцелуларном транспорту нутријената и других молекула, мембранској фузији, структуралној подршци и заштити (Amm и сар., 2014). Функција протеина је превасходно одређена њиховом структуром. Додатно, конформација протеина у великој мери зависи од услова у ћелији и под негативним је утицајем реактивних молекула и других стресних фактора који могу индуковати грешке у формирању функционалног облика (Goldberg, 2003; Amm и сар., 2014; Zhou и сар., 2016; Hasan и сар., 2017). Међутим, и различити фактори стреса индукују синтезу нових протеина који биљкама повећавају адаптивну вредност побољшавањем преживљавања у неповољним условима. У основи овакве стресно-индуковане синтезе протеина налазе се различити извори стреса чије трајање и тежина проузрокују диференцијалну експресију гена, што доводи до промена у генским продуктима, укључујући и mRNA и протеине (Sharma и Dubey, 2016). Додатни проблем у нормалном функционисању протеина условљен је и присуством реактивних врста кисеоника, али и реактивних врста азота (RNS), које, реагујући са специфичним протеинима, доводе до пост-транслационих модификација (Spoel и Loake, 2011). Оксидација се може догодити путем већег броја механизма као што су реверзибилна S-глутатионација, S-нитрозилација или карбонилација специфичних аминокиселина (Choudhury и сар., 2017), при чему је све већи број доказа који указују на узајамно дејство између нитрозилације и карбонилације протеина у регулисању и ремоделирању протеома током одговора биљака на неповољне услове (Gietler и сар., 2017). Формирање карбонилне групе код протеина настаје или оксидацијом катализованом од стране метала или индиректном реакцијом продуката липидне пероксидације са аминокиселинама. Додатно, карбонилација може бити индукована модификацијом протеина под дејством ROS. Последиčno, структура и функција протеина је промењена, а степен карбонилације је у вези са генерисаним ROS и стресним условима (Levine, 2002; Lounifi и сар., 2013; Choudhury и сар., 2017). Нитрозилација, са друге стране, представља инкорпорацију NO-групе уз промену активности протеина која је често праћена инактивацијом ензимских компоненти одбрамбеног система и смањењем активности ензима (Romero-Puertas и сар., 2013).

Повећана концентрација укупних солубилних протеина у клијанцима испитиваних генотипова босиљка, која прати високе концентрације нутријената, може бити последица индукције

синтезе протеина у условима стреса. Нагомилавање реактивних азотних и кисеоничних врста услед развоја клијанаца на медијумима са високом концентрацијом акумулираних јона у подлози (превасходно нитратни и амонијумови јони) доводи до протеинских модификација које, заједно са неуклоњеним реактивним врстама, стварају неадекватне услове који су праћени појачаном синтезом протеина, али и инактивацијом ензима антиоксидативне заштите. Синтеза „стресно-толерантних“ протеина чест је пример дугорочних адаптација на услове стреса (Biswal и Biswal, 1999; Nakamoto и Niyama, 1999; Sharma и Dubey, 2016), а такође је познато и да биљне ћелије, нарочито оне у корену, избегавају токсичност амонијума тако што га брзо конвертују у аминокиселине, било преко апсорбованог амонијума или преко амонијума насталог асимилацијом нитрата (Zervoudakis и сар. 2015). Додатно је висока концентрација праћена и падом активности протеолитичких ензима, тј. одлагањем трошења резерви протеина, пошто је протеолиза примарнији процес у односу на синтезу протеина код клијанаца чије се развиће одвија при неповољним условима (Sharma и Dubey, 2016).

Високо софистицирани и ефикасни антиоксидативни механизам (како ензиматски, тако и не-ензиматски) омогућава превазилажења нарушене ћелијске хомеостазе и оштећења индукованих стресом (Gill и Tuteja, 2010; Hussain и сар., 2016). Резултати добијени анализирањем активности супероксид дисмутазе, каталазе, аскорбат пероксидазе, гвајакол пероксидазе и пирогалол пероксидазе у деловима клијанаца гајених под различитим нутритивним режимом указују на постојање усклађености у активности различитих ензима у циљу превазилажења индукованог стреса. Међутим, како у активности и у корелацији у активности између наведених ензима и под строго контролисаним *in vitro* условима постоје варирања у зависности од испитиваног генотипа и извора нутритивног стреса, може се потврдити да је одговор антиоксидативних ензима босилјка генотипски специфичан.

Супероксид дисмутаза, група металоензима која катализује дисмутацију супероксида до кисеоника и воде, су код биљака детектоване у корену, листовима, плодовима и семенима, и у овим биљним деловима обезбеђују ћелијама основну заштиту од оксидационог оштећења (Giannopolitis и Ries, 1977; Terperman и Dunsmuir, 1990; Bernard и сар., 2014; Feng и сар., 2016; Zouari и сар., 2017). Резултати великог броја студија последњих година указују на заштитну улогу супероксид дисмутаза у условима абиотичког и биотичког стреса као што су температурна варирања, салинитет, тешки метали и др. (Wang и сар. 2004; Pilon и сар., 2011; Asensio и сар., 2012; Feng и сар., 2015; Feng и сар., 2016). Међутим, у различитим условима спољашње средине утврђено је да SOD гени имају различит образац експресије, што резултира другачијом активношћу супероксид дисмутаза са истим кофактором код различитих биљних врста (Gómez и сар., 1999; Wu и сар., 1999; Baek и Skinner,

2003; Feng и сар., 2015). На основу добијених резултата за испитиване генотипове босиљка гајених под различитим нутритивним режимом уочен је исти тренд опадања активности супероксид дисмутаза са повећањем концентрације нутријената код свих генотипова са нитратних медијума. Међутим, разлике између генотипова постају уочљиве у присуству амонијумових јона. *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal је једини генотип код кога је супероксид дисмутаза генерално активнија у корену, али активност овог ензима у условима нутритивног стреса опада и у корену и у изданцима, па се, посматрано у односу на активност супероксид дисмутаза, овај генотип може сматрати сензитивним. Присуство NH_4NO_3 индукује виши ниво активности супероксид дисмутаза, како у надземним, тако и у подземним органима свих клијанаца. Са повећањем доступности нутријената и амонијума, активност супероксид дисмутаза значајно расте у изданцима *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese и у корену *Ocimum basilicum* var. *minimum* и *Ocimum citriodorum*. Способност повећања активности супероксид дисмутаза у условима стреса сматра се карактеристиком генотипова толерантних на стресне услове. До различитих варирања у активности овог ензима у зависности од делова клијанаца може доћи услед промене у активности већ постојећих форми или синтезом нових, при чему код свих испитиваних генотипова не морају бити присутне све форме. Виши ниво активности у амонијачним медијумима указује на виши степен формирања супероксид анјон-радикала код биљака које асимилију амонијум заједно са нитратима. Пад у активности супероксид дисмутаза у одговарајућим деловима клијанаца услед пролонгираног нутритивног стреса указује на неколико могућности: у оваквим условима ова група ензима не носи кључну улогу у уклањању супероксид анјон-радикала за дато ткиво, већ се у овај процес укључују или друге ензимске или не-ензимске копоненте; нагомилавање и повећана концентрација реактивних врста доводе до инактивације супероксид дисмутаза оксидацијом тиол групе; висока концентрација јона у медијуму може редуковати апсорпцију и транслокацију Fe и Mn, па редукција активности може настати услед недостатака есенцијалних метала неопходних за каталитичке процесе овог ензима (Giroto и сар., 2016). Присуство различитих изоформи супероксид дисмутаза у листовима генотипова босиљка означених као *small size-leaf* и *large size-leaf* потврђено је од стране Attia и сар. (2011). Према Landi и сар. (2013) високе концентрације различитих хемијских елемената у подлози индукују промене у активности супероксид дисмутаза код босиљка, али се ниво активности разликује у односу на испитивани генотип. Према овим ауторима, „Tigulio“, тј. зеленолисну сорту босиљка карактерише виши ниво активности супероксид дисмутаза у стресним условима у односу на „Red Rubin“, тј. сорту босиљка са љубичастим листовима.

Ензими који припадају групи каталаза јесу универзално присутне оксидоредуктазе које разграђују водоник-пероксид до воде и молекула кисеоника. Познато је да постоји неколико

генетички различитих изоформи које се синтетишу на ткивно-специфични и развојно-зависни начин (Verma и Dubey, 2003; Zervoudakis и сар., 2015). Када су у питању испитивани генотипови босиљка, активност каталазе је генотипски специфична и са различитим нивоима активности у односу на испитиване делове клијанаца. Као и у случају супероксид дисмутазе, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal је једини генотип код кога је каталаза генерално активнија у корену него у изданцима, што само може потврдити да су у изданцима овог генотипа за уклањање реактивних врста вероватно задужене не-ензимске компоненте оксидационе заштите. Најуочљивија је разлика која постоји у нивоу активности каталаза у изданцима и корену генотипа *Ocimum basilicum* var. *minimum* са скоро 30 пута активнијим ензимом у изданцима, при чему активност ензима расте са порастом концентрације нутријената. Сличан образац активности је потврђен и од стране Zervoudakis и сар. (2015) у корену и изданцима босиљка гајеног на подлогама са три различита нивоа азота. Аутори су показали значајне разлике у активности каталазе у испитиваним деловима клијанаца, при чему је активност каталазе била неколико пута већа у младим изданцима у односу на корен. Према овим ауторима, у листовима босиљка доминантан је монофункционални изоензим, док је у корену бифункционални каталаза-пероксидаза изоензим. *Ocimum basilicum* var. *minimum* је уједно и једини генотип чија активност каталазе расте у изданцима са порастом концентрације нутријената. Додатно, ензим показује и виши ниво активности у третманима у којима су присутни амонијумови јони. У случају генотипа *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese и *Ocimum x citriodorum* постоји висок ниво корелације између активности супероксид дисмутазе и каталазе. Као и у случају активности супероксид дисмутазе, у изданцима *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese и активност каталазе опада са порастом концентрације нитратних медијума, док је у присуству амонијумових јона овај ензим значајно активнији. Коренска каталаза генотипа *Ocimum x citriodorum* прати супероксид дисмутазну активност, тј. са порастом концентрације амонијачних третмана расте и активност каталазе. Значајна функција каталазе у уклањању водоник-пероксида код различитих сорти босиљка потврђена је у случају водног стреса (Heidari и Golpayegani, 2012), ниске температуре (Wongsheree и сар., 2009), тешких метала (Stancheva и сар., 2014) и соли (Tarchoune и сар., 2013).

Осим као неизбежни продукти примарног метаболизма чија је продукција интензивирана у стресним условима, реактивне врсте се такође користе и као сигнални молекули за регулисање различитих физиолошких процеса. Водоник-пероксид лако дифундује кроз ћелијске мембране, па врло лако може довести до мембранских оштећења. Међутим, данас се зна да је, без обзира на оштећења која може произвести, водоник-пероксид значајан сигнални молекул укључен у различите развојне метаболичке процесе код биљака попут развоја коренских длака, диференцијације ксилема,

програмиране ћелијске смрти (Saxena и сар., 2016), клијања семена (Barba- Espin и сар., 2011), сенесценцији (Liao и сар., 2012), цветању (Liu и сар., 2013), равоју корена (Ma и сар., 2014, Niu и Liao, 2016).

За разлику од каталаза које директно врше конверзију водоник-пероксида до воде и кисеоника, аскорбат пероксидазе захтевају аскорбат-регенеративни систем, тј. активност ових ензима је у вези са аскорбат-глутатион циклусом у коме је прва реакција циклуса (реакција између водоник-пероксида и аскорбата) катализована од стране овог ензима (Sofa и сар., 2015). Аскорбат пероксидаза (класа I пероксидаза) је ефикасни регулатор хомеостазе ROS и максимално доприноси уклањању водоник-пероксида. Пошто су изоформе овог ензима присутне у различитим ћелијским компартментима, аскорбат пероксидазе су и значајни регулатори развојног процеса. Значај аскорбат пероксидаза није везан искључиво за хлоропласте, овај ензим обавља своју функцију и у цитосолу, пероксизомима и митохондријама, али транскрипциона експресија A-POX гена је ткивно и развојно зависна, а под утицајем је и различитих абиотичких фактора (Caverzan и сар., 2012). Додатно, исти фактор стреса може изменити експресију цитосолних и хлоропластних A-POX гена на различите начине (Dabrowska и сар., 2007). Експерименталним истраживањима на различитим генотиповима босилка потврђено је да, и у случају активности аскорбат пероксидазе, присуство амонијумових јона индукује виши ниво активности антиоксидативних ензима, и да активност аскорбат пероксидазе у великој мери прати активности супероксид дисмутазе. Способност одржавања високог нивоа активности овог ензима чак и при високим концентрацијама нутријената евидентирана је у изданима *Ocimum basilicum* var. *minimum* и у кореновима *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese и *Ocimum* x *citriodorum*. Као и у случају супероксид дисмутазе и каталазе, активност аскорбат пероксидазе опада код *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal и ензим је генерално активнији у корену. Иако аскорбат пероксидаза примарну функцију обавља у хлоропластима, снижавање фотосинтетског капацитета клијанаца у стресним условима уз одржавање активности аскорбат пероксидазе у изданима и корену може указивати на интензивирање електрон-транспортног процеса у митохондријама и пероксизомима. Познато је да су каталазе укључене у директни процес детоксикације који се врши непосредним разлагањем водоник-пероксида до воде и кисеоника, док аскорбат пероксидазе своју функцију обављају посредством оксидације супстрата, као што је процес лигнификације (Rucińska и сар., 1999). Низак ниво активности каталазе са повећаном активношћу аскорбат пероксидазе у кореновима свих генотипова босилка (изузев *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal) указује да се током јувенилне фазе водоник-пероксид у подземним деловима клијанаца превасходно троши у процесима оксидације, пре него у процесима детоксификације.

Пероксидазе су једна од најистраживанијих група ензима код биљака и њихова мултифункционална улога је вишеструко потврђена. Бројне физиолошке функције повезане су управо са пероксидазама, међу којима су лигнификација, одговор на стресне услове, одбрана против патогена и сенесценција (Shigeto и Tsutsumi, 2016). Различитост пероксидазних функција последица је постојања различитих форми ензима и сматра се да је велики број пероксидазних изоформи еволутивно настао као одговор новоформираних органа на специфичне услове спољашње средине, па је и функција пероксидаза битна компонента у одговору биљака како на развојне процесе, тако и на услове спољашње средине (Ghamsari и сар., 2007). У класу III пероксидаза се, локацијски посматрано, убрајају вакуоларни ензими и ензими ћелијског зида, међутим, повезаност ових ензима са секреторним путевима који омогућавају њихову миграцију унутар ћелијског зида условљава и њихову појаву и активност у цитосолу и ванћелијском простору, а могу бити повезане и са плазма мембраном (Mäder, 1992; Vianello и сар., 1997; Verma и Dubey, 2003). За разлику од аскорбат пероксидаза које су, поред цитоплазме, лоциране превасходно у органелама, пероксидазе класе III се не налазе у органелама, али се и за ову групу ензима претпоставља да имају велики значај у регулацији растења и развића (Ghamsari и сар., 2007). Такође, док се аскорбат пероксидазе углавном сматрају специфичним за супстрат, тј. за аскорбат као електрон-донор, пероксидазе класе III могу користити различита ароматична једињења као доноре електрона (попут гвајакола и пирогалолa). Додатно, гвајакол пероксидазе идентификоване у плазмaмембранама корена соје (*Glycine max* L. (Merr.)) могу, у присуству фенола, као доноре електрона да користе аскорбат (Vianello, 1997). Једна од главних функција пероксидаза лоцираних у ћелијским зидовима повезана је са оксидацијским процесима прекурсора лигнина, остацима тирозина у гликопротеинима и остацима хидроксициметне киселине пектина и хемицелулозних полисахарида. Ови процеси зависе од концентрације водоник-пероксида у ћелијском зидову, па плазма мембранске пероксидазе, као и пероксидазе ћелијског зида, значајну улогу остварују у детоксификацији водоник-пероксида на релацији ћелијски зид – плазмaлeма и на тај начин доприносе заштити фосфолипидног двослоја од липидне пероксидације и потенцијалног оштећења пропустљивости мембрана од стране водоник-пероксида (Iyama и сар., 1994; Vianello и сар., 1997).

Ензими из класе III пероксидаза узрочници су и деградације флавоноида, јер приликом коришћења ових ароматичних једињења у функцији донора електрона катализују деградацију структуре ароматичних једињења отварањем ароматичног прстена (Kalsoom и сар., 2015). Потврђено је да повећање активности пероксидаза које користе ароматичне електрон-доноре доводи до смањења концентрације флавоноида, пошто је уочено да повећање активности пирогалол пероксидазе доводи до смањења концентрације флавоноида тако што подстиче разградњу

антоцијанина у присуству водоник-пероксида. На тај начин антоцијанидин настао хидролизом антоцијанина може потенцијално бити супстрат за ове ензиме (Zhang и сар., 2005; Jing и сар., 2013). Ово је у складу са резултатима добијеним за активност пирогалол пероксидаза у случају генотипа *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal, при чему најнижу концентрација флавоноида прати и висока активност овог ензима. Додатно, висок ниво активности пирогалол пероксидазе праћен је и ниском активношћу гвајакол пероксидазе, потенцијално услед недостатка супстрата узрокованог деградацијском активношћу пирогалол пероксидазе. Такође је, и у случају *Ocimum x citriodorum* виши ниво активности коренских пирогалол пероксидаза праћен нижом концентрацијом флавоноида у овим деловима клијанаца. Са друге стране, пирогалол је флавоноид из групе катехина и поред деградацијске улоге, може бити активна компонента флавоноида у процесу уклањања реактивних врста (Jing и сар., 2013), тако да виша активност пирогалол пероксидазе у изданцима *Ocimum basilicum* var. *minimum* и *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese може бити последица веће концентрације флавоноида у овим деловима клијанаца. Резултати такође указују да, када су у питању тестирани генотипови босилка, значајна варирања у активности гвајакол пероксидазе изазвана су углавном амонијачним стресом, при чему је умерено повећање активности овог ензима у условима високе концентрације нутријената и нутритивног стреса уочено само у случају изданак *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese, али и при умереним концентрацијама у изданцима и коренима *Ocimum x citriodorum*. Са изузетком *Ocimum basilicum* var. *minimum*, гвајакол пероксидаза, у испитиваним условима, виши ниво активности показује у подземним органима. Иако максималне концентрације амонијачних нутријената инхибирају активност овог ензима у случају *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal, вероватно услед токсичног дејства јона, у свим испитиваним условима индукованог стреса активност гвајакол пероксидазе је остала константна. Може се закључити да клијанци успевају да одрже услове хомеостазе у којима активност III класе пероксидаза није нарушена, као и да је активност ових ензима вероватно додатно омогућена високом концентрацијом фенолних једињења која обезбеђују антиоксидативне функције ових пероксидаза, а познати су чиниоци секундарног метаболизма босилка.

Нутритивна депривација са једне, и сони стрес изазван вишком нутријената са друге стране, јесу комплексни процеси који доводе до координисаних промена на различитим нивоима организације биљног метаболизма. Један од главних чиниоца прилагођавања биљака стресним условима јесу продукти секундарног метаболизма. Један од начина класификовања биљних секундарних метаболита је и класификација заснована на путевима синтезе секундарних метаболита (Bourgaud и сар., 2001).

Биолошка синтеза фенилпропаноидних компоненти (значајних компоненти метаболизма босилјка) одвија се, највећим делом, посредством пута шикимске киселине и регулисана је од стране неколико ензима, укључујући фенилаланин амонијум лиазу (PAL) и тирозин амонијум лиазу (TAL). Први корак овог метаболичког пута, катализован од стране PAL, прати деаминација L-фенилаланина и метаболити који резултирају овим кораком могу бити класификовани у фенолне деривате, укључујући и есенцијална уља, кумарине, флавоноиде, лигнине и друге компоненте (Ziaei и сар., 2012; Rigano и сар., 2016). Биљни полифеноли значајно варирају у својој структури, али за ове природне антиоксидансе карактеристично је присуство најмање једног ароматичног прстена и једна или више хидроксилних група. Акумулација фенолних компоненти представља адаптивну карактеристику на услове стреса и синтеза фенола може бити индукована, али и инхибирана у зависности од концентрације нутријената. И поред већег броја истраживања релативно мало се зна о корелацији у активности PAL и садржаја секундарних метаболита у различитим деловима истих експерименталних биљака у зависности од доступности нутријената. Са друге стране, утврђивање обима метаболичких разлика између органа је значајна компонента интегративног разумевања одговора читаве биљке (de Miguel и сар., 2016). Активност фенилаланин амонијум лиазе се може довести у директну везу са синтезом најзаступљенијих секундарних метаболита из групе фенолних киселина (рузмаринске и кофеинске киселине) у случају изданака *Ocimum basilicum* var. *minimum* и *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal, као и коренова *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese и *Ocimum* x *citriodorum*. Међутим, и у случају одсуства директне везе између активности PAL и концентрације наведених фенолних киселина, може се увидети корелација између активности овог ензима и концентрације укупних фенолних једињења, флавоноида, али и укупне антиоксидативне активности. Иако је активност PAL ензима неопходна за синтезу фенолних једињења (укључујући и флавоноиде), повећана активност овог ензима не мора увек бити праћена и повећаном концентрацијом ових секундарних метаболита пошто циметна киселина може бити конвертована у велики број других једињења. Assis и сар. (2001) наводе да се повећана активност PAL ензима (без одговарајућег повећања у концентрацији укупних фенолних једињења) може сматрати делом целокупног, интегративног одговора биљног организма.

Током интензивираниог растења и развића синтеза фенолних једињења може бити супстратно или енергетски ограничена услед ограничености различитих прекурсора (Lattanzio и сар., 2009). Најзначајнији утицај на продукцију секундарних метаболита има доступност компоненти, попут азотних и карбонилних метаболичких компоненти (Aharoni и Galili, 2011; Jakovljević и сар., 2017b). Резултати спроведени у овим истраживањима указују да када су нутритивни услови задовољени и ниво азота одговарајући, растење и фотосинтеза су фаворизовани, али када је концентрација

нутријената неадекватна процеси растења су умањени, а синтеза секундарних метаболита фаворизована, и у складу су са Herms и Mattson (1992) и Nguyen и Niemeyer (2008). Већа концентрација метаболита у условима неадекватним за максималне фотосинтетичке процесе додатно може бити објашњења хипотезом баланса између азота и угљеника, при чему, по овој хипотези, у условима лимитиране концентрације азота, клијанци путем секундарног метаболизма продукују метаболите богате угљеником. Међутим, промене у концентрацији угљеника и азота у медијумима, али и у целокупној доступности (услед процеса фотосинтезе и синтезе протеина) не доводе увек до аналогних промена у нивоу угљеникових и азотних примарних метаболита (Aharoni и Galili, 2011), па се виши ниво активности PAL може довести и у везу са продукцијом секундарних метаболита који садрже азот, попут гликозида, танина и других метаболита на бази азота.

Биљне врсте рода *Ocimum* карактерише висока концентрација фенолних компоненти, али њихов квантитативно-квалитативни састав варира у зависности од многобројних фактора. Упоредјујући карактеристике секундарног метаболизма испитиваних генотипова на основу укупне количине фенолних једињења, концентрације флавоноида, али и укупне антиоксидативне активности, може се закључити да се клијанци свих генотипова који су гајени *in vitro* карактеришу високом концентрацијом наведених метаболита, као и значајном способношћу уклањања слободних радикала. Количина укупних фенолних једињења је код свих испитиваних генотипова била већа у корену у односу на изданке и према количини укупних фенолних једињења генотипови заузимају следећи редослед: *Ocimum* x *citriodorum* < *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese < *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal < *Ocimum basilicum* var. *minimum*. На основу количине флавоноида испитивани генотипови заузимају следећи редослед: *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal < *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese < *Ocimum* x *citriodorum* < *Ocimum basilicum* var. *minimum*.

На основу укупне антиоксидативне активности испитивани генотипови заузимају исти редослед као и у случају укупних фенолних једињења, тј.: *Ocimum* x *citriodorum* < *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese < *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal < *Ocimum basilicum* var. *minimum*. Међутим, и поред најниже вредности антиоксидативне способности, добијене IC₅₀ вредности за корене и изданке генотипа *Ocimum* x *citriodorum* су у сваком од коришћених третмана биле ниже од 100 µg mL⁻¹. За сваки од испитиваних генотипова већу антирадикалску способност су демонстрирали подземни делови.

HPLC анализом је потврђено да се, као и у случају укупне антиоксидативне активности и количине укупних фенолних једињења, већа концентрација одабраних фенолних киселина, тј. рузмаринске и кофеинске киселине, синтетише у коренима *in vitro* гајених генотипова босиљка у

односу на изданке. На основу концентрације рузмаринске киселине испитивани генотипови заузимају следећи редослед: *Ocimum* x *citriodorum* < *Ocimum basilicum* var. *minimum* < *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal < *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese.

На основу концентрације кофеинске киселине испитивани генотипови заузимају следећи редослед: *Ocimum* x *citriodorum* < *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal < *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese < *Ocimum basilicum* var. *minimum*.

Ранијим истраживањима је утврђено да квантитативни и квалитативни састав фенолних једињења, као и њихова антиоксидативна активност код представника рода *Ocimum* варира, како у зависности од испитиване сорте босиљка, тако и од порекла узорака, количине доступног азота, количине калијума и интензитета ултраљубичастог зрачења (Javanmardi и сар., 2002; Nguyen и Niemeyer, 2008; Nguyen и сар., 2010; Scagel и Lee, 2012; Kiferle и сар., 2013; Flanigan и Niemeyer, 2014; Ghasemzadeh и сар., 2016;). Међутим, већина наведених студија узима у обзир надземне делове босиљка, превасходно листове, занемарујући како остале биљне делове, тако и процесе растења и развића (Scagel и Lee, 2012). Варијабилност концентрације укупних фенолних једињења, појединачних фенолних киселина, али и антиоксидативне активности утврђена је у листовима 15 различитих генотипа босиљка од стране Kwee и Niemeyer (2011). Иако наведеним истраживањем нису обухваћени генотипови коришћени у овом експерименталном раду, измерени садржај укупних фенолних једињења, као и концентрација рузмаринске и кофеинске киселине за све испитиване генотипове вишеструко је нижа у односу на резултате добијене за *Ocimum basilicum* var. *minimum*, *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal и *Ocimum* x *citriodorum*. Према овим ауторима, садржај појединачних фенолних киселина значајан је фактор укупне антиоксидативне активности екстракта босиљка. Варирања у количини и саставу фенолних компоненти и антиоксидативне активности потврђена су у зависности од сорте љубичастог босиљка (Flanigan и Niemeyer, 2014), од зрелости биљке у моменту узорковања (McCance и сар., 2016), од примене ултраљубичастог зрачења (Ghasemzadeh и сар., 2016), од варирања у концентрацији калијума и азота у подлози (Nguyen и Niemeyer, 2008; Nguyen и сар., 2010), при чему су у свим наведеним истраживањима коришћени листови босиљка, а добијене вредности су ниже у поређењу са вредностима добијеним испитивањем наведена четири генотипа у овом истраживању. Изузетно висока концентрација рузмаринске киселине у кореновима *in vitro* гајених клијанаца босиљка у складу је са вредностима добијеним за корене генотипа *Ocimum basilicum* L. cv. Genovese хидропонично гајеног на редукованом нитратном медијуму (Kiferle и сар., 2013). Nguyen и Niemeyer (2008) истичу да промене у концентрацији азота у подлози, уз одабир

одговарајућих сорти, могу бити ефективни метод за повећање количине полифенолних компоненти код босиљка.

Присуство интраспецијских разлика током раних фаза растења и развића у процесима синтезе метаболита при строго контролисаним условима указују на значајан ефекат квантитативног и квалитативног састава минералних елемената и јасног дефинисања нутритивних захтева за сваки од тестираних генотипова у циљу постизања боље примарне продукције и интензивније синтезе секундарних метаболита. Имајући у виду високе концентрације рузмаринске и кофеинске киселине које су добијене из екстракта корена клијанаца босиљка, као и значајну антиоксидативну активност и количину укупних фенолних једињења, укључујући и флавоноиде, у коренима тестираних генотипова, култура клијанаца и протоколи спроведени у овом истраживању, уз примену дефинисаних нутритивних захтева, могу имати вишеструки апликативни значај, како за даље проучавање физиологије ових значајних представника, тако и за екстракцију значајних метаболита.

ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата истраживања спроведених у овој докторској дисертацији, а са циљем увођења одабраних генотипова босиљка у *in vitro* услове и утврђивања интраспецијских разлика у синтези примарних структурних компоненти, као и разлика ензимских и не-ензимских компоненти одбрамбеног система у условима пролонгираног нутритивног стреса, могу се извести следећи закључци:

- Успешно су развијени протоколи и поуздано је успостављена *in vitro* култура клијанаца за четири генотипа босиљка: *Ocimum basilicum* var. *minimum* (ситнолисни босиљак), *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese (крупнолисни босиљак), *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal (љубичасти босиљак) и *Ocimum x citriodorum* (лимунски босиљак).
- Контролисани услови и дефинисани фактори растења и развића, уз одсуство флуктуација абиотичких и биотичких фактора спољашње средине, чине културу клијанаца погодним системом за праћење физиолошких одговора на појединачне факторе стреса. Овај вид културе ткива је за наведене генотипове коришћен по први пут и апликативан је за различите сорте босиљка.
- Концентрација елемената минералне исхране (ниска, умерена и висока) остварује различите, генотипски специфичне ефекте на процес клијања, синтезу структурних компоненти, параметре антиоксидативне заштите и целокупни секундарни метаболизам.
- Присуство амонијачне форме азота умањује способност семена да клијају код свих испитиваних генотипова; у присуству амонијумових јона почетак клијања је одложен, време клијања успорено и брзина клијања редукована.

- Највећи проценат проклијалих семена, као и најбрже и најуниформније клијање евидентирано је за семена *Ocimum* x *citriodorum* у поређењу са осталим генотиповима. Процес клијања се за *Ocimum* x *citriodorum* најбоље одвија при минималним концентрацијама нутријената. Семенима *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal је, такође, најповољнија минимална концентрација нутријената, док су семена *Ocimum basilicum* var. *minimum* и *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese успешније клијала при високим концентрацијама нутријената, али знатно спорије у односу на претходна два генотипа.
- При високим концентрацијама нутријената интензивира се синтеза фотосинтетичких пигмената генотипа *Ocimum basilicum* var. *minimum*, док умерена и ниска концентрација нутријената нарушавају синтезу основних структурних компоненти примарног метаболизма. *Ocimum basilicum* var. *minimum* је једини генотип коме погодује висока концентрација минералних елемената (у одсуству амонијумових јона).
- Најповољнији услови за обављање фотосинтетичких процеса код генотипа *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese укључују умерену и ниску концентрацију нутријената, при чему синтеза фотосинтетичких пигмената није инхибирана у присуству амонијумових јона.
- Висока концентрација нутријената инхибира синтезу фотосинтетичких пигмената код *Ocimum* x *citriodorum* и *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal, док су најповољнији нитратни медијуми са ниском концентрацијом нутријената.
- У условима пролонгираног нутритивног стреса индукована је синтеза протеина и снижена активност појединачних ензима оксидативне заштите се не може довести у везу са недостатком ових структурних компоненти.
- Испитивањем ензимских компоненти одбрамбеног система утврђено је постојање интраспецијских разлика у активности појединачних ензима оксидативног стреса, при чему у очувању хомеостазе значајнији ефекат има координација специфичних

биохемијских и физиолошких механизма у односу на појединачне антиоксидативне компоненте.

- Активност супероксид дисмутазе је у условима пролонгираног стреса индукована у изданцима *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese и *Ocimum basilicum* var. *minimum*, као и коренима *Ocimum basilicum* var. *minimum* и *Ocimum* x *citriodorum*, док *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal нема способност активације супероксид дисмутазе ни у изданцима ни у корену.
- Активност каталазе је специфична за надземне делове клијанаца *Ocimum basilicum* var. *minimum* и *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese; у коренима је индукована само у случају *Ocimum* x *citriodorum*, док генотип *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal нема способност индукције ни овог ензима у условима нутритивног стреса.
- Активност аскорбат пероксидазе у надземним деловима клијанаца у великој мери прати активности супероксид дисмутазе и каталазе, док низак ниво каталазе у кореновима, уз индуковану активност аскорбат пероксидазе у овим деловима клијанаца, указује на укључивање овог ензима у процесе оксидације, пре него детоксификације водоник-пероксида.
- Одсуство значајнијих ефеката пролонгираног нутритивног стреса на активност гвајакол пероксидазе и пирогалол пероксидазе указују на одржавање хомеостазе у изданцима и коренима испитиваних генотипова, а активност пероксидаза III класе у вези је и са високом концентрацијом фенолних једињења босиљка.
- Код *Ocimum basilicum* var. *minimum*, *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal и *Ocimum* x *citriodorum* присуство амонијум-нитрата изазива повишену активност ензимских компоненти антиоксидативне заштите.

- Активност фенилаланин амонијум лиаза (PAL) може се довести у везу са концентрацијом доступних нутријената, при чему форма азотне исхране не утиче на конвертовање *trans*-циметне киселине у продукте секундарног метаболизма.
- Повећана активност фенилаланин амонијум лиаза (PAL ензим) праћена је високом концентрацијом рузмаринске и кофеинске киселине у изданима *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* cv. Dark Opal и *Ocimum basilicum* var. *minimum*, као и коренова *Ocimum basilicum* var. *basilicum* cv. Genovese и *Ocimum* x *citriodorum*. Одсуство директне везе између концентрације ових фенолних киселина и активности фенилаланин амонијум лиаза у осталим третманима указује на укључивање и других путева синтезе приликом продукције ових метаболита, уз истовремено учествовање PAL ензима у синтези других метаболичких компоненти секундарног метаболизма, обзиром да је у оваквим случајевима активности PAL ензима у вези са антиоксидативном активношћу и концентрацијом укупних фенолних једињења.
- Синтеза секундарних метаболита је интензивирана у условима умереног или високог нутритивног стреса и ткивно је специфична за све испитиване генотипове босиљка, при чему се корени клијанаца карактеришу значајно већом концентрацијом укупних фенолних једињења и укупном антиоксидативном активношћу.

ЛИТЕРАТУРА

- Adomako-Bonsu, A.G., Chan, S.L., Pratten, M., Fry, J.R. (2017). Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicology In Vitro*, 40, 248-255.
- Aghaei, K., Ehsanpour, A.A., Komatsu, S. (2009). Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(12), 1095-1103.
- Aharoni, A., Galili, G. (2011). Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 239-244.
- Ali, Y., Aslam, Z., Ashraf, M.Y., Tahir, G.R. (2004). Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield components of rice genotypes grown under saline environment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 3, 221-225.
- Al-Mudaris, M.A. (1998). Notes on various parameters recording the speed of seed germination. *Der Tropenlandwirt-Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics*, 99(2), 147-154.
- Amm, I., Sommer, T., Wolf, D.H. (2014). Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843, 182-196. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.031
- Angelovici, R., Fait, A., Zhu, X., Szymanski, J., Feldmesser, E., Fernie, A. R., Galili, G. (2009). Deciphering transcriptional and metabolic networks associated with lysine metabolism during Arabidopsis seed development. *Plant Physiology*, 151(4), 2058-2072.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 601-639.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141(2), 391-396.

- Asensio, A.C., Gil-Monreal, M., Pires, L., Gogorcena, Y., Aparicio-Tejo, P.M., Moran, J.F. (2012). Two Fe-superoxide dismutase families respond differently to stress and senescence in legumes. *Journal of Plant Physiology*, 169, 1253-1260. doi:10.1016/j.jplph.2012.04.019
- Ashraf, M., Harris, P.J.C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*, 51, 163-190.
- Assis, J.S., Maldonado, R., Muñoz, T., Escribano, M.I., Merodio, C. (2001). Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 23, 33-39.
- Attaran, E., Major, I. T., Cruz, J. A., Rosa, B. A., Koo, A. J., Chen, J., ... Howe, G. A. (2014). Temporal dynamics of growth and photosynthesis suppression in response to jasmonate signaling. *Plant physiology*, 165(3), 1302-1314.
- Attia, H., Ouhibi, C., Ellili, A., Msilini, N., Bouzaïen, G., Karray, N., Lachaâl, M. (2011). Analysis of salinity effects on basil leaf surface area, photosynthetic activity, and growth. *Acta physiologiae plantarum*, 33(3), 823-833.
- Ayala-Astorga, G.I., Alcaraz-Melendez, L. (2010). Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments, and proline in *Paulownia imperialis* (Siebold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann & Hemsley) grown *in vitro*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(5), 1-11.
- Bacha, H., Tekaya, M., Drine, S., Guasmi, F., Touil, L., Enneb, H., Triki, T., Cheour, F., Ferchichi, A. (2017). Impact of salt stress on morpho-physiological and biochemical parameters of *Solanum lycopersicum* cv. Microtom leaves. *South African Journal of Botany*, 108, 364-369.
- Baek, K.H., Skinner, D.Z. (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science*, 165, 1221-1227. doi:10.1016/S0168-9452(03)00329-7
- Bai, H., Euring, D., Volmer, K., Janz, D., Polle, A. (2013). The nitrate transporter (NRT) gene family in poplar. *PloS one*, 8(8), e72126.
- Bajpai, J., Srivastava, A. (2015). *In vitro* response of black gram genotypes to herbicide stress and elevation of antioxidative defence system. *Acta physiologiae plantarum*, 37(9), 182.

- Balabusta, M., Szafranska, K., Posmyk, M.M. (2016). Exogenous melatonin improves antioxidant defense in cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) germinated under chilling stress. *Frontiers in Plant Science*, 287(7), 575. doi:10.3389/fpls.2016.00575
- Baque, M.A., Lee, E.J., Paek, K.Y. (2010). Medium salt strength induced changes in growth, physiology and secondary metabolite content in adventitious roots of *Morinda citrifolia*: the role of antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia lyase. *Plant Cell Reports*, 29, 685-694.
- Barba-Espín, G., Diaz-Vivancos, P., Job, D., Belghazi, M., Job, C., Hernández, J.A. (2011). Understanding the role of H₂O₂ during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. *Plant Cell and Environment*, 34, 1907-1919. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02386.x
- Beatović, D., Krstić-Milošević, D., Trifunović, S., Šiljegović, J., Glamočlija, J., Ristić, M., Jelačić, S. (2015). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia. *Records of Natural Products*, 9(1), 62-75.
- Beatović, D.V. (2013). Evaluacija genotipova bosiljka (*Ocimum* spp.) gajenih u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytica Biochemistry*, 44, 276-287.
- Bekhradi, F., Delshad, M., Marín, A., Luna, M.C., Garrido, Y., Kashi, A., Babalar, M., Gil, M.I. (2015). Effects of salt stress on physiological and postharvest quality characteristics of different Iranian genotypes of basil. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 56(6), 777-785.
- Bentham, G. (1832). *Ocimum*. In *Labiatarum Genera and Species*, London, Ridgeway, 1-19.
- Bernard, F., Brulle, F., Dumez, S., Lemiere, S., Platel, A., Nessler, F., Cuny, D., Deram, A., Vandenbulcke, F., (2014). Antioxidant responses of annelids, Brassicaceae and Fabaceae to pollutants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 273-303.
- Bhuvaneshwari, K., Gokulanathan, A., Jayanthi, M., Govindasamy, V., Milella, L., Lee, S., Yang, D.C., Girija, S. (2016). Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. *in vitro* culture be a potential source of secondary metabolites?. *Food Chemistry*, 194, 55-60.
- Biswal, B.A.S.A.N.T.I., Biswal, U.C. (1999). Photosynthesis under stress: stress signals and adaptive response of chloroplasts. In *Handbook of Plant and Crop Stress*, 2nd edition, CRC Press, 315-336.

- Bojović, B., Stojanović, J. (2005). Chlorophyll and carotenoid content in wheat cultivars as a function of mineral nutrition. *Archives of Biological Science*, 57, 283-290.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839-851.
- Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., Lattanzio, V. (2015). Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26378-26394.
- Carović-Stanko, K., Liber, Z., Besendorfer, V., Javornik, B., Bohanec, B., Kolak, I., Satovic, Z. (2010). Genetic relations among basil taxa (*Ocimum* L.) based on molecular markers, nuclear DNA content, and chromosome number. *Plant Systematics and Evolution*, 285(1-2), 13-22.
- Carović-Stanko, K., Šalinović, A., Grdiša, M., Liber, Z., Kolak, I., Satovic, Z. (2011). Efficiency of morphological trait descriptors in discrimination of *Ocimum basilicum* L. accessions. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 145(2), 298-305.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1011-1019.
- Chacón, I.D.L.C., Riley-Saldaña, C.A., González-Esquinca, A.R. (2013). Secondary metabolites during early development in plants. *Phytochemistry Reviews*, 12(1), 47-64.
- Chaowuttikul, C., Palanuvej, C., Ruangrunsi, N. (2018). *In vitro* biological activities of *Lonicera japonica* flowering bud compared to chlorogenic acid, rosmarinic acid and caffeic acid. *Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 27-34.
- Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E., Mittler, R., (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Christophe, S., Jean-Christophe, A., Annabelle, L., Alain, O., Marion, P., Anne-Sophie, V. (2011). Plant N fluxes and modulation by nitrogen, heat and water stresses: a review based on comparison of legumes and non legume plants. In *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations*, InTech, 79-118.
- Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G., Kim, S.H., Kim, J.G., Kim, C. H. (2004). Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on

- hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *The FASEB Journal*, 18(14), 1670-1681.
- da Silva, D.M., de Souza, K.R.D., Boas, L.V.V., Alves, Y.S., Alves, J.D. (2017). The effect of magnesium nutrition on the antioxidant response of coffee seedlings under heat stress. *Scientia Horticulturae*, 224, 115-125.
- Dąbrowska, G., Kata, A., Goc, A., Szechyńska-Hebda, M., Skrzypek, E. (2007). Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 49, 7-17.
- Dajić, Z. (2006). Salt stress. In *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*, Springer Netherlands, 41-99.
- Daneshian, A., Gurbuz, B., Cosge, B., Ipek, A. (2009). Chemical components of essential oils from basil (*Ocimum basilicum* L.) grown at different nitrogen levels. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 3(3), 9-13.
- 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. doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053
- de Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C.E.B., Gomes-Filho, E. (2006). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 56(1), 87-94.
- de Miguel, M., Guevara, M.Á., Sánchez-Gómez, D., de María, N., Díaz, L.M., Mancha, J.A., Fernandez de Simon, B., Cadahía, E., Desai, N., Aranda, I., Cervera, M.T. (2016). Organ-specific metabolic responses to drought in *Pinus pinaster* Ait. *Plant Physiology and Biochemistry*, 102, 17-26.
- de Sousa, M.B., Melo, O.F., De Castro, C.M., Ximenes, E.A., da Silva, N.H., da Silva, M. (2005). Evaluation of the gastric antiulcer, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from *Ocimum minimum* Linn. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24(3), 331-336.
- Dias, M.C., Correia, S., Serôdio, J., Silva, A.M.S., Freitas, H., Santos, C. (2018). Chlorophyll fluorescence and oxidative stress endpoints to discriminate olive cultivars tolerance to drought and heat episodes. *Scientia Horticulturae*, 231, 31-35.
- Dode, L.B., Bobrowski, V.L., Braga, E.J.B., Seixas, F.K., Schuch, M.W. (2003). *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 25(2), 435-437.

- Domínguez-Valdivia, M.D., Aparicio-Tejo, P.M., Lamsfus, C., Cruz, C., Martins-Loução, M.A., Moran, J.F. (2008). Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and sensitive plants. *Physiologia Plantarum*, 132, 359-369.
- Domitrović, R., Potočnjak, I., Crnčević-Orlić, Ž., Škoda, M. (2014). Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 66, 321-328.
- Dudai, N., Poljakoff-Mayber, A., Mayer, A.M., Putievsky, E., Lerner, H.R. (1999). Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology*, 25(5), 1079-1089.
- Elansary, H.O., Mahmoud, E.A. (2015). In vitro antioxidant and antiproliferative activities of six international basil cultivars. *Natural Product Research*, 29(22), 2149-2154.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A., Ma, F. (2002). Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), 335-351.
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76-82.
- Espanany, A., Fallah, S., Tadayyon, A. (2016). Seed priming improves seed germination and reduces oxidative stress in black cumin (*Nigella sativa*) in presence of cadmium. *Industrial Crops and Products*, 79, 195-204.
- Feng, K., Yu, J., Cheng, Y., Ruan, M., Wang, R., Ye, Q., Zhou, G., Li, Z., Yao, Z., Yanh, Y., Zheng, Q., Wan, H. (2016). The SOD gene family in tomato: identification, phylogenetic relationships, and expression patterns. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1279.
- Feng, X., Lai, Z., Lin, Y., Lai, G., Lian, C. (2015). Genome-wide identification and characterization of the superoxide dismutase gene family in *Musa acuminata* cv. Tianbaojiao (AAAgroup). *BMC Genomics*, 16, 823. doi:10.1186/s12864-015-2046-7
- Fernandez, I.C.D., Luque, E.G., Mercado, F.G., Marrero, J.M. (2015). Germination responses of *Limonium insigne* (Coss.) Kuntze to salinity and temperature. *Pakistan Journal of Botany*, 47, 807-812.

- Filip, S. (2014). Ekstrakcija bosiljka (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae) ugljendioksidom u superkritičnom stanju i modelovanje ekstrakcionog Sistema. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- Flanigan, P.M., Niemeyer, E.D. (2014). Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition, and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chemistry*, 164, 518-526.
- Foyer, C.H., Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155, 93-100.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119(3), 355-364.
- Fraser, C.M., Chapple, C. (2011). The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, 9, e0152.
- Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., Stitt, M. (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, 46(4), 533-548.
- Gaglione, M., Malgieri, G., Pacifico, S., Severino, V., D'Abrosca, B., Russo, L., Fiorentino, A., Messere, A. (2013). Synthesis and biological properties of caffeic acid-PNA dimers containing guanine. *Molecules*, 18(8), 9147-9162.
- Galili, G., Amir, R., Fernie, A.R. (2016). The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 153-178.
- Ganapathy, G., Keerthi, D., Nair, R.A., Pillai, P. (2016). Correlation of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and tyrosine ammonia lyase (TAL) activities to phenolics and curcuminoid content in ginger and its wild congener, *Zingiber zerumbet* following *Pythium myriotylum* infection. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 777-785.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrre, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., Métraux, J.P. (2008). Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 147(3), 1279-1287.
- Gengmao, Z., Yu, H., Xing, S., Shihui, L., Quanmei, S., Changhai, W. (2015). Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. *Industrial Crops and Products*, 64, 175-181.

- Ghamsari, L., Keyhani, E., Golkhoo, S. (2007). Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. *Iranian Biomedical Journal*, 11(3), 137-146.
- Ghasemzadeh, A., Ashkani, S., Baghdadi, A., Pazoki, A., Jaafar, H. Z., Rahmat, A. (2016). Improvement in flavonoids and phenolic acids production and pharmaceutical quality of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by ultraviolet-B irradiation. *Molecules*, 21(9), 1203.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K.(1977).Superoxide dismutase: I. Occurrence in higherplants. *Plant Physiology*, 59, 309-314.
- Gietler, M., Nykiel, M., Orzechowski, S., Fettke, J., Zagdańska, B. (2017). Protein carbonylation linked to wheat seedling tolerance to water deficiency. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 84-95.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Giroto, E., Ceretta, C.A., Rossato, L.V., Farias, J.G., Brunetto, G., Miotto, A., Tiecher, L.T., de Conti, L., Lourenci, R.C., Schmatz, R., Giachini, A., Nicoloso, T.F. (2016). Biochemical changes in black oat (*avena strigosa* schreb) cultivated in vineyard soils contaminated with copper. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, 199-207.
- Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426, 895-899. doi: 10.1038/nature02263
- Gómez, J.M., Hernández, J.A., Jiménez, A., delRío, L.A., Sevilla, F. (1999). Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research*, 31(1), 11-18. doi:10.1080/10715769900301261
- Goth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196, 143-151.
- Grayer, R.J., Vieira, R.F., Price, A.M., Kite, G.C., Simon, J.E., Paton, A.J. (2004). Characterization of cultivars within species of *Ocimum* by exudate flavonoid profiles. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(10), 901-913.
- Grayer, R.J., Kite, G.C., Goldstone, J., Bryan, S.E., Paton, A., Putievsky, E. (1996). Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, 43(5), 1033-1039.

- Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213-220.
- Gupta, M., Bhaskar, P.B., Sriram, S., Wang, P.H. (2017). Integration of omics approaches to understand oil/protein content during seed development in oilseed crops. *Plant Cell Reports*, 36(5), 637-652.
- Hachiya, T., Sakakibara, H. (2016). Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2501-2512. doi: 10.1093/jxb/erw449.
- Hakim, F.L., Shankar, C.G., Girija, S. (2007). Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9109-9117.
- Hamada Abdelgawad, G.Z., Hegab, M.M., Pandey, R., Asard, H., Abuelsoud, W. (2016). High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. *Frontiers in Plant Science*, 7, 276.
- Hasan, M., Cheng, Y., Kanwar, M.K., Chu, X.Y., Ahammed, G.J., Qi, Z.Y. (2017). Responses of plant proteins to heavy metal stress – A Review. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1492.
- He, X., Gao, S. (2008). Changes of antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities during *Chimonanthus praecox* seed maturation. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63, 569-573.
- Hediye Sekmen, A., Türkan, I., Takio, S. (2007). Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum*, 131(3), 399-411.
- Heidari, M., Golpayegani, A. (2012). Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11(1), 57-61.
- Hermans, C., Hammond, J.P., White, P.J., Verbruggen, N. (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science*, 11(12), 610-617.
- Hermis, D.A., Mattson, W.J. (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67, 283-335.
- Hiltunen, R., Holm, Y. (2003). Basil: the Genus *Ocimum*. CRC Press.

- Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R.P., Pogson, B.J. (2016). Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants. *Trends in Plant Science*, 21(9), 792-803.
- Hussain, S., Khan, F., Cao, W., Wu, L., Geng, M. (2016). Seed priming alters the production and detoxification of reactive oxygen intermediates in rice seedlings grown under sub-optimal temperature and nutrient supply. *Frontiers in Plant Science*, 7, 439. doi:10.3389/fpls.2016.00439
- Iglesias-Fernández, R., Rodríguez-Gacio, M.C., Barrero-Sicilia, C., Carbonero, P., Matilla, A. (2011). Three endo- β -mannanase genes expressed in the micropylar endosperm and in the radicle influence germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Planta*, 233(1), 25-36.
- Imen, T., Cristina, S., Riccardo, I., Flavia, N.I., Zeineb, O. (2012). Phenolic acids and total antioxidant activity in *Ocimum basilicum* L. grown under Na₂SO₄ medium. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(48), 5868-5875.
- Iyama, K., Lam, T.B.T., Stone, B.A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology*, 104, 315-320.
- Jakovljević, D., Topuzović, M., Stanković, M., Bojović, B. (2017a). Changes in antioxidant enzyme activity in response to salinity-induced oxidative stress during early growth of sweet basil. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 58(3), 240-246.
- Jakovljević, D., Stanković, M., Bojović, B., Topuzović, M. (2017b). Regulation of early growth and antioxidant defense mechanism of sweet basil seedlings in response to nutrition. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(11), 243.
- Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress responses of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14, 1511-1527.
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H.P., Vivanco, J.M. (2002). Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5878-5883.
- Jbir-Koubaa, R., Charfeddine, S., Ellouz, W., Saidi, M.N., Drira, N., Gargouri-Bouزيد, R., Nouri-Ellouz, O. (2015). Investigation of the response to salinity and to oxidative stress of interspecific potato somatic hybrids grown in a greenhouse. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120(3), 933-947.
- Jia, L., Xu, W., Li, W., Ye, N., Liu, R., Shi, L., Rubaiyath Bin Rahman, A.N.M., Fan, M., Zhang, J. (2013). Class III peroxidases are activated in proanthocyanidin-deficient *Arabidopsis thaliana* seeds. *Annals of Botany*, 111, 839-847.

- Jia, X., Sun, C., Li, G., Li, G., Chen, G. (2015). Effects of progressive drought stress on the physiology, antioxidative enzymes and secondary metabolites of *Radix astragali*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-14.
- Jian, S., Liao, Q., Song, H., Liu, Q., Lepo, J. E., Guan, C., ... Zhang, Z. (2017). NRT1.1-dependent NH_4^+ toxicity in Arabidopsis is associated with disturbed balance between NH_4^+ uptake and assimilation. *bioRxiv*, 241174.
- Jing, G., Huang, H., Yang, B., Li, J., Zheng, X., Jiang, Y. (2013). Effect of pyrogallol on the physiology and biochemistry of litchi fruit during storage. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 19.
- Kalaji, H.M., Oukarroum, A., Alexandrov, V., Kouzmanova, M., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I., Cetner, M., Allakhverdiev, I., Goltsev, V. (2014). Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. *Plant Physiology and Biochemistry*, 81, 16-25.
- Kalisz, A., Pokluda, R., Jezdinsky, A., Sękara, A., Grabowska, A., Gil, J., Neugebauerová, J. (2016). Chilling-induced changes in the antioxidant status of basil plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 196. doi: 10.1007/s11738-016-2214-7
- Kalsoom, U., Bhatti, H.N., Asgher, M. (2015). Characterization of plant peroxidases and their potential for degradation of dyes: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(6), 1529-1550.
- Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6), 709.
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.
- Kiferle, C., Maggini, R., Pardossi, A. (2013). Influence of nitrogen nutrition on growth and accumulation of rosmarinic acid in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in hydroponic culture. *Australian Journal of Crop Science*, 7, 321-327.
- Knaggs, A.R. (2003). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 20(1), 119-136.
- Kukavica, B., Morina, F., Janjić, N., Boroja, M., Jovanović, L., Veljović- Jovanović, S. (2013). Effects of mixed saline and alkaline stress on the morphology and anatomy of *Pisum sativum* L.: the role of

- peroxidase and ascorbate oxidase in growth regulation. *Archives of Biological Science*, 65, 265-278.
- Kumar, J.S.P., Prasad, R.S., Banerjee, R., Thammineni, C. (2015). Seed birth to death: dual actions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany*, 116, 663-668. doi:10.1093/aob/mcv098
- Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytotherapy research*, 21(7), 615-621. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2129>
- Kuzovkina, I.N., Vdovitchenko, M.Y. (2011). Genetically transformed roots as a model system for studying physiological and biochemical processes in intact roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(5), 941-948.
- Kwee, E.M., Niemeyer, E.D. (2011). Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 128(4), 1044-1050.
- Labra, M., Miele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M., Sala, F. (2004). Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Science*, 167(4), 725-731.
- Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.M. (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 569-593.
- Landi, M., Guidi, L., Pardossi, A., Tattini, M., Gould, K.S. (2014). Photoprotection by foliar anthocyanins mitigates effects of boron toxicity in sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Planta*, 240, 941-953.
- Landi, M., Pardossi, A., Remorini, D., Guidi, L. (2013). Antioxidant and photosynthetic response of a purple-leaved and a green-leaved cultivar of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to boron excess. *Environmental and Experimental Botany*, 85, 64-75.
- Landmann, C., Hücherig, S., Fink, B., Hoffmann, T., Dittlein, D., Coiner, H.A., Schwab, W. (2011). Substrate promiscuity of a rosmarinic acid synthase from lavender (*Lavandula angustifolia* L.). *Planta*, 234(2), 305-320.

- Lattanzio, V., Cardinali, A., Ruta, C., Fortunato, I.M., Lattanzio, V.M., Linsalata, V., Cicco, N. (2009). Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoot cultures under nutritional stress. *Environmental and Experimental Botany*, 65, 54-62.
- Lazof, D.B., Bernstein, N. (1999). The NaCl induced inhibition of shoot growth: the case for isturbed nutrition with special consideration of calcium. *Advances in Botanical Research*, 29, 113-189.
- Lee, J., Scagel, C.F. (2009). Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, 115, 650-656.
- Lee, S.J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K.G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131-137.
- Lemoine, R. (2000). Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 246-262.
- Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 790-796.
- Liang, Y., Chen, Q.I.N., Liu, Q., Zhang, W., Ding, R. (2003). Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology*, 160(10), 1157-1164.
- Liao, W.B., Zhang, M.L., Huang, G.B., Yu, J.H. (2012). Hydrogen peroxide in the vase solution increases vase life and keeping quality of cut Oriental × Trumpet hybrid lily ‘Manissa’. *Scientia Horticulturae*, 139, 32-38. doi:10.1016/j.scienta.2012.02.040
- Linka, N., Weber, A.P. (2010). Intracellular metabolite transporters in plants. *Molecular Plant*, 3(1), 21-53.
- Little, D.Y., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A., Malamy, J.E. (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2. 1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13693-13698.
- Liu, J., Macarisin, D., Wisniewski, M., Sui, Y., By, S., Droby, S., Norelli, J., HersHKovitz, V. (2013). Production of hydrogen peroxide and expression of ros-generating genes in peach flower petals in

- response to host and non-host fungal pathogens. *Plant Pathology*, 62, 820-828. doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02683.x
- Lounifi, I., Arc, E., Molasiotis, A., Job, D., Rajjou, L., Tanou, G. (2013). Interplay between protein carbonylation and nitrosylation in plants. *Proteomics*, 13, 568-578.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 19, 265-275.
- Ma, F., Wang, L., Li, J., Samma, M.K., Xie, Y., Wang, R., Zhang, J., Shen, W. (2014). Interaction between HY1 and H₂O₂ in auxin-induced lateral root formation in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 85, 49-61. doi:10.1007/s11103-013-0168-3
- Macovei, A., Pagano, A., Leonetti, P., Carbonera, D., Balestrazzi, A., Araújo, S.S. (2017). Systems biology and genome-wide approaches to unveil the molecular players involved in the pre-germinative metabolism: implications on seed technology traits. *Plant Cell Reports*, 36(5), 669-688.
- Mader, M. (1992). Compartmentation of peroxidase isoenzymes in plant cells. In Penel, C., Gaspar, T.H., Greppin, H. (eds.): Plant peroxidases 1980-1990: topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects. University of Geneva, Switzerland, 37-46.
- Maeda, H.A. (2016). Lignin biosynthesis: tyrosine shortcut in grasses. *Nature Plants*, 2(6), 16080.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Mandal, S.M., Chakraborty, D., Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*, 5(4), 359-368.
- Martínez, F., Palencia, P., Alonso, D., Oliveira, J. A. (2017). Advances in the study of nitrification inhibitor DMPP in strawberry. *Scientia Horticulturae*, 226, 191-200.
- Mavi, K., Demir, I., Matthews, S. (2010). Mean germination time estimates the relative emergence of seed lots of three cucurbit crops under stress conditions. *Seed Science and Technology*, 38, 14-25.
- McCance, K.R., Flanigan, P.M., Quick, M.M., Niemeyer, E.D. (2016). Influence of plant maturity on anthocyanin concentrations, phenolic composition, and antioxidant properties of 3 purple basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 53, 30-39.

- McElroy, J.S., Kopsell, D.A. (2009). Physiological role of carotenoids and other antioxidants in plants and application to turfgrass stress management. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37(4), 327-333.
- Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240-16265.
- Miller, A.J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S.J., Wells, D.M. (2007). Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2297-2306.
- Mir, B.A., Mir, S.A., Khazir, J., Tonfack, L.B., Cowan, D.A., Vyas, D., Koul, S. (2015). Cold stress affects antioxidative response and accumulation of medicinally important withanolides in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Industrial Crops and Products*, 74, 1008-1016.
- Mishra, A.K., Rai, R., Agrawal, S.B. (2013). Individual and interactive effects of elevated carbon dioxide and ozone on tropical wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars with special emphasis on ROS generation and activation of antioxidant defence system. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 50, 139-149.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.
- Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, R.A., Fry, S.C., Krieger-Liszkay, A., Leubner-Metzger, G. (2009). In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*, 150(4), 1855-1865.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 15, 473-497.
- Nakamoto, H.I.T.O.S.H.I., Hiyama, T.E.T.S.U.O. (1999). Heat-shock proteins and temperature stress. Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, New York, 399-416.
- Neuhaus, H.E., Wagner, R. (2000). Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 307-323.
- Nguyen, P.M., Kwee, E.M., Niemeyer, E.D. (2010). Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, 123(4), 1235-1241.

- Nguyen, P.M., Niemeyer, E.D. (2008). Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8685-8691.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N.C., Pogson, B.J. (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(1), 68-82.
- Niu, L., Liao, W. (2016). Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in Plant Science*, 7, 230.
- Noorhosseini, S.A., Jokar, N.K., Damalas, C.A. (2017). Improving seed germination and early growth of garden cress (*Lepidium sativum*) and basil (*Ocimum basilicum*) with hydro-priming. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(1), 323-334.
- Okutan, H., Ozcelik, N., Yilmaz, H. R., Uz, E. (2005). Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clinical Biochemistry*, 38(2), 191-196.
- Oliveira, I.C., Lam, H.M., Coschigano, K., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G. (1997). Molecular-genetic dissection of ammonium assimilation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35(3), 185-198.
- Orčić, D., Francišковић, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143, 48-53.
- Patel, R.P., Singh, R., Rao, B.R., Singh, R.R., Srivastava, A., Lal, R.K. (2016). Differential response of genotype $\times$ environment on phenology, essential oil yield and quality of natural aroma chemicals of five *Ocimum* species. *Industrial Crops and Products*, 87, 210-217.
- Paton, A.L.A.N., Harley, R.M., Harley, M.M. (1999). *Ocimum*: an overview of classification and relationships. In *Basil: the genus Ocimum*. Amsterdam, The Netherlands, Harwood Academic, 1-38.
- Paton, A., Putievsky (1996). Taxonomic problems and cytotaxonomic relationships between and within varieties of *O. basilicum* and related species (Labiatae). *Kew Bulletin*, 51, 509-524.
- Pattnaik, S., Chand, P.K. (1996). In vitro propagation of the medicinal herbs *Ocimum americanum* L. syn. *O. canum* Sims. (hoary basil) and *Ocimum sanctum* L. (holy basil). *Plant Cell Reports*, 15(11), 846-850.

- Pérez-Fernández, M.A., Calvo-Magro, E., Montanero-Fernández, J., Oyola-Velasco, J.A. (2006) Seed germination in response to chemicals: effect of nitrogen and pH in the media. *Journal of Environmental Biology*, 27, 13-20.
- Perić, M.D. (2014). Физиолошка и фитохемијска карактеризација биљака врсте *Rindera umbellata* (Waldst. & Kit.) Bunge гајених *in vitro*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
- Petersen, M. (2013): Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews*, 12(1), 207-227.
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K. H., Sander, M., Weitzel, C., Wolters, S. (2009): Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70(15–16), 1663-1679.
- Petersen, M., Häusler, E., Karwatzki, B., Meinhard, J. (1993). Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta*, 189(1), 10-14.
- Phippen, W.B., Simon, J.E. (2000). Anthocyanin inheritance and instability in purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Heredity*, 91(4), 289-296.
- Pilon, M., Ravet, K., Tapken, W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 989-998. doi:10.1016/j.bbabo.2010.11.002
- Polesskaya, O.G., Kashirina, E.I., Alekhina, N.D. (2004). Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51, 615-620.
- Polesskaya, O.G., Kashirina, E.I., Alekhina, N.D. (2006). Effect of salt stress on antioxidant system of plants as related to nitrogen nutrition. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53, 186-192.
- Politeo, O., Jukic, M., Milos, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, 101(1), 379-385.
- Pushpangadan, P. (1974). Studies on reproduction and hybridisation of *Ocimum* species with view to improving their quality. Ph.D. thesis, Aligarh Muslim University, Aligarh, India.

- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazinc, M., Cazinc, J.C., Bailleulb, F., Trotinb, F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 35-42.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, M. I., Alonso, F.J., de Forchetti, S.M., Tigier, H., Valpuesta, V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, 122(4), 1119-1128.
- Raab, T.K., Terry, N. (1995). Carbon, nitrogen, and nutrient interactions in *Beta vulgaris* L. as influenced by nitrogen source, NO_3^- versus NH_4^+ . *Plant Physiology*, 107(2), 575-585.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N., Mehrotra, S. (2004). Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science*, 167(5), 1159-1169.
- Rajaeian, S.O., Ehsanpour, A.A. (2015). Physiological responses of tobacco plants (*Nicotiana rustica*) pretreated with ethanolamine to salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62(2), 246-252.
- Ranal, M.A., Santana, D.G.D. (2006). How and why to measure the germination process?. *Brazilian Journal of Botany*, 29(1), 1-11.
- Reguera M., Peleg Z., Abdel-Tawab Y.M., Tumimbang E.B., Delatorre C.A., Blumwald E. (2013). Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. *Plant Physiology*, 163, 1609-1622.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M., Gojon, A. (2006). A central role for the nitrate transporter NRT2. 1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 140(3), 909-921.
- Repčák, M., Pal'ove-Balang, P., Dučaiová, Z., Sajko, M., Bendek, F. (2014). High nitrogen supply affects the metabolism of *Matricaria chamomilla* leaves. *Plant Growth Regulation*, 73(2), 147-153.
- Rigano, M.M., Raiola, A., Docimo, T., Ruggieri, V., Calafiore, R., Vitaglione, P., Ferracane, R., Frusciante, L., Barone, A. (2016). Metabolic and molecular changes of the phenylpropanoid pathway in tomato (*Solanum lycopersicum*) lines carrying different *Solanum pennellii* wild chromosomal regions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1484. doi:10.3389/fpls.2016.01484
- Robards, K. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.

- Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., Sandalio, L.M. (2013). Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Frontiers in Plant Science*, 4, 373. doi: 10.3389/fpls.2013.00373.
- Rosental, L., Nonogaki, H., Fait, A. (2014). Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*, 24(1), 1-15.
- Rucińska, R., Waplak, S., Gwóźdź, E.A. (1999). Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(3), 187-194.
- Sahoo, Y., Pattnaik, S.K., Chand, P.K. (1997). *In vitro* clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 33(4), 293-296.
- Sajko, M., Kovalíková-Dučaiová, Z., Paľove-Balang, P., Repčák, M. (2017). Physiological responses of *Matricaria chamomilla* to potassium nitrate supply and foliar application of ethephon. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-10.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), 136-138.
- Saxena, I., Srikanth, S., Chen, Z. (2016). Cross talk between H₂O₂ and interacting signal molecules under plant stress response. *Frontiers in Plant Science*, 7, 570.
- Scagel, C. F., Lee, J. (2012). Phenolic composition of basil plants is differentially altered by plant nutrient status and inoculation with mycorrhizal fungi. *HortScience*, 47(5), 660-671.
- Scarpati, M., Oriente, G. (1958). Isolation and constitution of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis* (Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.)). *Ricerca Scientia*, 28, 2329-2333.
- Schjoerring, J.K., Husted, S., Mäck, G., Mattsson, M. (2002). The regulation of ammonium translocation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53, 883-890.
- Şen, A. (2012). Oxidative stress studies in plant tissue culture. In Antioxidant Enzyme. InTech, 59-88.
- Shao, Q. S., Shu, S., Du, J., Xing, W.W., Guo, S.R., Sun, J. (2015). Effects of NaCl stress on nitrogen metabolism of cucumber seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62(5), 595-603.

- Sharma, P., Dubey, R.S. (2016). Protein synthesis by plants under stressful conditions. In Handbook of plant and crop stress, IIIed, CRC Press, 465-518.
- Shigeto, J., Tsutsumi, Y. (2016). Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytologist*, 209(4), 1395-1402.
- Shilpa, K., Selvakkumar, C., Senthil, A.K., Lakshmi, B.S. (2010). *In vitro* root culture of *Ocimum sanctum* L. and evaluation of its free radical scavenging activity. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 101(1), 105-109.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1305-1319.
- Shumskaya, M., Wurtzel, E.T. (2013) The carotenoid biosynthetic pathway: thinking in all dimensions. *Plant Science*, 208, 58-63.
- Siddique, I., Anis, M. (2008). An improved plant regeneration system and *ex vitro* acclimatization of *Ocimum basilicum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(4), 493-499.
- Singh, N.K., Sehgal, C.B. (1999). Micropropagation of 'Holy Basil' (*Ocimum sanctum* Linn.) from young inflorescences of mature plants. *Plant Growth Regulation*, 29(3), 161-166.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13561-13578.
- Spoel, S.H., Loake, G.J. (2011). Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 358-364.
- Sreenivasulu, N. (2017). Systems biology of seeds: deciphering the molecular mechanisms of seed storage, dormancy and onset of germination. *Plant Cell Reports*, 36(5), 633-635.
- Srinieng, K., Saisavoey, T., Karnchanatat, A. (2015). Effect of salinity stress on antioxidative enzyme activities in tomato cultured *in vitro*. *Pakistan Journal of Botany*, 47(1), 1-10.

- Srivastava, S., Cahill, D.M., Conlan, X.A., Adholeya, A. (2014). A novel in vitro whole plant system for analysis of polyphenolics and their antioxidant potential in cultivars of *Ocimum basilicum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41), 10064-10075.
- Stahl, W., Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345-351.
- Stancheva, I., Geneva, M., Markovska, Y., Tzvetkova, N., Mitova, I., Todorova, M., Petrov, P. (2014). A comparative study on plant morphology, gas exchange parameters, and antioxidant response of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. grown on industrially polluted soil. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 89-102.
- Stanković, M. (2012). Biološki efekti sekundarnih metabolita vrsta roda *Teucrium* L. flore Srbije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet.
- Stitt, M. (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(3), 178-186.
- Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., Sakata, K. (1994). A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58(10), 1780-1783. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.58.1780>
- Takeda, H., Tsuji, M., Inazu, M., Egashira, T., Matsumiya, T. (2002). Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmacology*, 449(3), 261-267.
- Tang, G.B., Song, B.Z., Zhao, L.L., Sang, X.S., Wan, H.H., Zhang, J., Yao, Y.C. (2013). Repellent and attractive effects of herbs on insects in pear orchards intercropped with aromatic plants. *Agroforestry Systems*, 87(2), 273-285.
- Tarchoune, I., Sgherri, C., Izzo, R., Lachaal, M., Ouerghi, Z., Navari-Izzo, F. (2010). Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(9), 772-777.
- Tarchoune, I., Degl'Innocenti, E., Kaddour, R., Guidi, L., Lachaâl, M., Navari-Izzo, F., Ouerghi, Z. (2012a). Effects of NaCl or Na₂SO₄ salinity on plant growth, ion content and photosynthetic activity in *Ocimum basilicum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 607-615.

- Tarchoune, I., Sgherri, C., Izzo, R., Lachaâl, M., Navari-Izzo, F., Ouerghi, Z. (2012b). Changes in the antioxidative systems of *Ocimum basilicum* L. (cv. Fine) under different sodium salts. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 1873-1881.
- Tarchoune, I., Sgherri, C., Baâtour, O., Izzo, R., Lachaâl, M., Navari-Izzo, F., Ouerghi, Z. (2013). Effects of oxidative stress caused by NaCl or Na₂SO₄ excess on lipoic acid and tocopherols in Genovese and Fine basil (*Ocimum basilicum*). *Annals of Applied Biology*, 163(1), 23-32.
- Tegeder, M., Weber, A.P.M. (2006). Metabolite transporters in the control of plant primary metabolism. In Annual Plant Reviews Volume 22: Control of primary metabolism in plants (eds W. C. Plaxton and M. T. McManus), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. doi: 10.1002/9780470988640.ch4
- Telci, I., Elmastas, M., Sahin, A. (2009). Chemical composition and antioxidant activity of *Ocimum* minimum essential oils. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(4), 568.
- Temple, S.J., Vance, C.P., Gantt, J.S. (1998). Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends in Plant Science*, 3(2), 51-56.
- Tepperman, J.M. Dunsmuir, P. (1990). Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Molecular Biology*, 14, 501-511. doi:10.1007/BF00027496
- Tzin, V., Galili, G. (2010). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant*, 3(6), 956-972.
- Ungar, I.A. (1995). Seed germination and seed-bank ecology of halophytes. In Seed Development and Germination. Marcel and Dekker Inc, New York.
- UPOV (2003). Basil (*Ocimum basilicum* L.) TG/200/1, april 9, 2003, Geneva
- Vågen, I. M., Moe, R., Ronglan, E. (2003). Diurnal temperature alternations (DIF/drop) affect chlorophyll content and chlorophyll a/chlorophyll b ratio in *Melissa officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L., but not in *Viola × wittrockiana* Gams. *Scientia Horticulturae*, 97(2), 153-162.
- Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M.V., Chaki, M., Pedrajas, J. R., Fernández-Ocaña, A., Del Río, L.A., Barroso, J.B. (2006). The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell and Environment*, 29(7), 1449-1459.

- Van Dongen, J.T., Gupta, K.J., Ramírez-Aguilar, S.J., Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R. (2011). Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. *Journal of Plant Physiology*, 168(12), 1434-1443.
- Verma, S., Dubey, R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164(4), 645-655.
- Vianello, A., Zancani, M., Nagy, G., Macrì, F. (1997). Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. *Journal of Plant Physiology*, 150(5), 573-577.
- Vieira, R.F., Goldsbrough, P., Simon, J.E. (2003). Genetic diversity of basil (*Ocimum* spp.) based on RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(1), 94-99.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2-20.
- Vujičić, M. (2016). Biohemijski i ekofiziološki odgovori odabranih vrsta mahovinana kontrolisani stres izazvan solima u akсениčnim uslovima. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
- Wang, B., Lüttge, U. Ratajczak, R. (2004). Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C3 halophyte *Suaeda salsa* L. *Journal of Plant Physiology*, 161, 285-293. doi:10.1078/0176-1617-01123
- Wang, G. F., Shi, L. P., Ren, Y. D., Liu, Q. F., Liu, H. F., Zhang, R. J., Li, Z., Zhu, F.H., He, P.L., Tang, W., Tao, P.Z., Li, C., Zhao, W.M., Zuo, J.P. (2009). Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antiviral Research*, 83(2), 186-190.
- Weitbrecht, K., Müller, K., Leubner-Metzger, G. (2011). *First off the mark: early seed germination*. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3289-3309.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307-313.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562-571.

- Wongsheree, T., Ketsa, S., van Doorn, W.G. (2009). The relationship between chilling injury and membrane damage in lemon basil (*Ocimum × citriodourum*) leaves. *Postharvest Biology and Technology*, 51(1), 91-96.
- Wu, G., Wilen, R.W., Robertson, A.J., Gusta, L.V. (1999). Isolation, chromosomal localization and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiology*, 120, 513-520. doi:10.1104/pp.120.2.513
- Zabka, M., Pavela, R., Prokinova, E. (2014). Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. *Chemosphere*, 112, 443-448.
- Zervoudakis, G., Salahas, G., Maria, R.O.D.I. (2015). Nitrogen nutrition effect on aeroponic basil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43, 561-567.
- Zhang, X., Liu, C.J. (2015). Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Molecular Plant*, 8(1), 17-27.
- Zhang, Z., Pang, X., Xuewu, D., Ji, Z., Jiang, Y. (2005). Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry*, 90(1), 47-52.
- Zhou, S., Okekeogbu, I., Sangireddy, S., Ye, Z., Li, H., Bhatti, S., Hui, D., McDonald, D.W., Yang, Y., Giri, S., Howe, K.J., Fish, T., Thannhauser, T.W. (2016). Proteome modification in tomato plants upon long-term aluminum treatment. *Journal of Proteome Research*, 15, 1670–1684. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00128
- Zhu, F., Asada, T., Sato, A., Koi, Y., Nishiwaki, H., Tamura, H. (2014). Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from Perilla leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4), 885-892.
- Ziaei, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Razavi, K. (2012) Gene expression and activity of phenyl alanine amonialyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stages. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10, 32-39.
- Zouari, M., Elloumi, N., Bellassoued, K., Ahmed, C.B., Krayem, M., Delmail, D., Elfeki, A., Ben Rouina, B., Ben Abdallah, F., Labrousse, P. (2017). Enzymatic antioxidant responses and mineral status in

roots and leaves of olive plants subjected to fluoride stress. South African Journal of Botany, 111, 44-49.

Коришчени интернет извори:

<https://i.pinimg.com/originals/66/ed/ea/66edea13c7122ae0c08dafb507feab0e.jpg>

<http://www.abryoungplants.com/?p=148&lang=en>

<https://www.seedparade.co.uk/news/growing-herbs/basil-in-pots/>

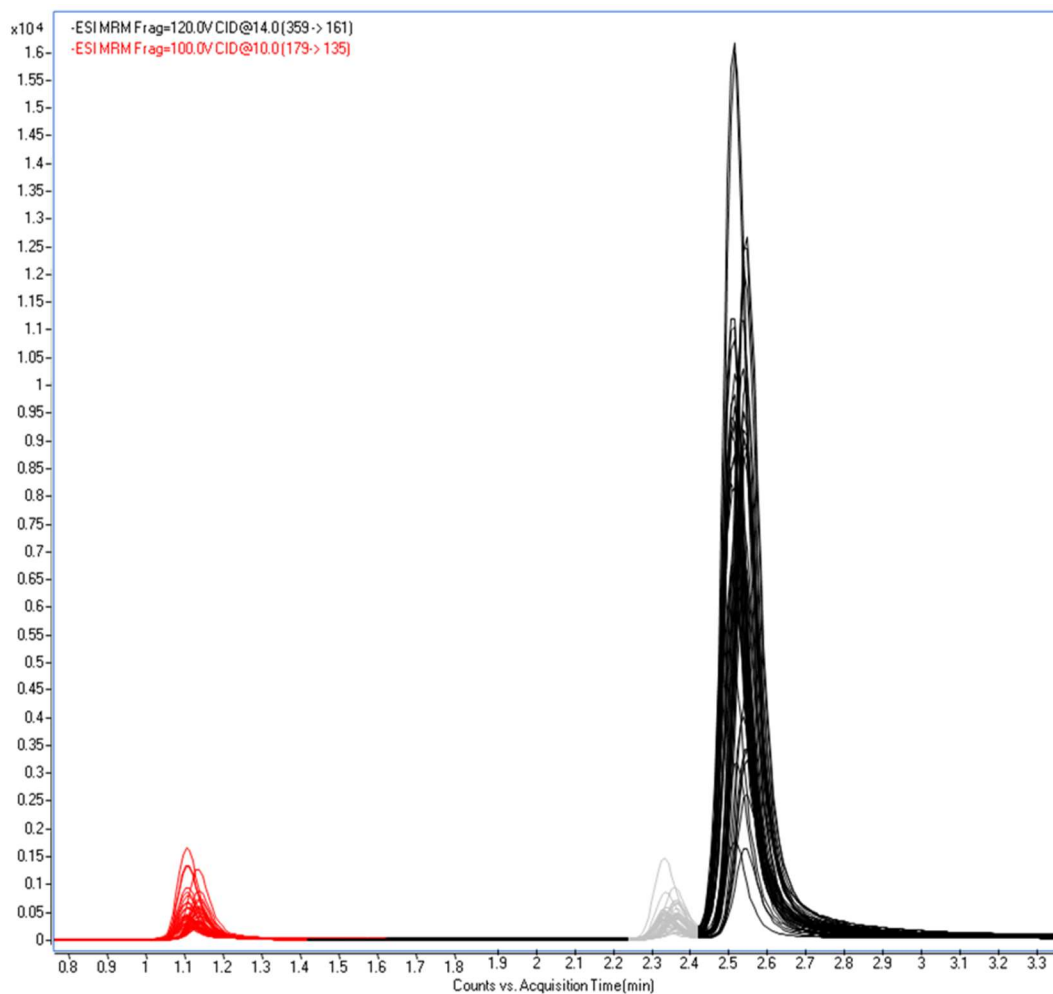
http://www.estabrooksonline.com/plants/herbs/plant.asp?id=ocimum_genovese

<http://www.delgarm.com>

<https://www.epicgardening.com/growing-basil/>

<http://www.hooksgreenherbs.com>

ПРИЛОЗИ



Прилог 1. Преклопљени хроматограми метанолних екстраката добијених из изданака и корена клијанаца различитих генотипова босиљка гајених *in vitro* при третманима са различитом концентрацијом нутријената и типом азотне исхране

нутријенти		концентрације нутријената у медијумима		
		третман 1	третман 2	третман 3
форма азота*	KNO ₃ третман „а“	6.18	12.36	24.7
	KNO ₃ + NH ₄ NO ₃ третман „б“	4.7 + 5.15	9.4 + 10.3	18.8 + 20.6
макроелементи*	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0.25	0.5	1
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.25	0.5	1
	KH ₂ PO ₄	0.25	0.5	1
микроелементи*	MnSO ₄ x 4H ₂ O	15	30	60
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	10	20	40
	KJ	1.25	2.5	5
	H ₃ BO ₃	12.5	25	50
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.025	0.05	0.1
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	0.05	0.1
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.25	0.5	1
комплекс гвожђа*	Na ₂ EDTA	0.025	0.05	0.1
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	0.025	0.05	0.1
витамини*	витамин В ₁	0.1	0.1	0.1
	витамин В ₆	0.5	0.5	0.5
	никотинска кис.	0.5	0.5	0.5
органи додаци***	казеин-хидролизат	2	2	2
	мио-инозитол	0.1	0.1	0.1
	сахароза	7.5	15	30

Прилог 2. Јединствени приказ коришћених третмана са различитим концентрацијама макро- и микронутријената и различитим формама азота

БИОГРАФИЈА

Драгана З. Јаковљевић је рођена 29.10.1986. године у Јагодини. Основну школу „Душан Поповић“ у Бетушићу и Средњу медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић“ у Крагујевцу је завршила са одличним успехом. Студије Биологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу је уписала школске 2005/2006. године и дипломирала 2010/2011. године, постигавши просечну оцену током студија 8.96. Докторске академске студије биологије је уписала школске 2011/2012. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. Положила је све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 10. Од 2012. до 2015. године била је стипендиста-докторанд Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, где је као истраживач-приправник распоређена на пројекту „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци“ – евиденциони број пројекта ИИИИ41010. У звање асистент за ужу научну област Физиологија биљака на Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу изабрана је 2015. године. Активно се бави реализацијом наставе и експерименталним радом у области Физиологија биљака.

Regulation of early growth and antioxidant defense mechanism of sweet basil seedlings in response to nutrition

Dragana Jakovljević¹ · Milan Stanković¹ · Biljana Bojović¹ · Marina Topuzović¹

Received: 27 June 2017 / Revised: 18 September 2017 / Accepted: 3 October 2017
© Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków 2017

Abstract Basil cultivars are among most used crops worldwide, but high level of morpho-physiological variations is mainly due to the cultivation characteristics. The present study aimed to investigate the physiological changes and the accumulation of secondary metabolites as a response to prolonged nutrient deprivation in shoots and roots of sweet basil (*Ocimum basilicum* L. var. *minimum*). Sweet basil seedlings were grown in media with quarter, half and full strength of micro and macronutrients under different levels of KNO_3 alone or in combination with different levels of NH_4NO_3 . Evaluated parameters included characteristics of germination, development of leaves, content of photosynthetic pigments and responses of different parameters related to oxidative stress. While the early growth is influenced mainly due to NH_4NO_3 presence, all the levels of nutrient supply were found to trigger and maintain the antioxidant defence system of sweet basil seedlings. With the variations among seedling parts, the ammonium nutrition was notably enhanced levels of activity of SOD, CAT, A-POX, G-POX and P-POX, but had no effect on total antioxidant activity and total

phenolic content, including flavonoids, which is mainly accumulated in nutrient deprived roots. In addition, phenylalanine ammonia-lyase activity was analysed and potential pathways of secondary metabolites synthesis were discussed. The enzymatic and non-enzymatic system in *O. basilicum* var. *minimum* seedlings was capable to reverse the stress conditions during growth under nutrient deprivation.

Keywords Antioxidant enzymes · Nutrition · Phenylalanine ammonia-lyase · Sweet basil · Secondary metabolites

Introduction

For normal physiological processes in plants, availability of macro and micro-nutrients is essential, especially during plant growth and development (Kalaji et al. 2014). As a main component of amino-acids and proteins, as well as a regulator of enzyme activities, nitrogen is required for energy metabolism (Hussain et al. 2016). Plant development depends on an appropriate concentration of nitrogen to synthesize main cellular compounds which are further necessary (Sánchez et al. 2004). This substantial element is available in different forms, but among them, nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) are primary nitrogen sources for plants (Sung et al. 2015). The plants produced visible changes in their growth and development if growing on the medium containing nitrate or ammonium under deficit or excess (Poleskaya et al. 2006).

Since plants can grow up in soils that contain unfavourable concentrations of essential elements, plants must sense changes in nutrient concentration to survive in nutrient deprived environment and to adjust growth to

Communicated by P. Wojtaszek.

✉ Dragana Jakovljević
draganaj@kg.ac.rs

Milan Stanković
mstankovic@kg.ac.rs

Biljana Bojović
biljanab@kg.ac.rs

Marina Topuzović
marina@kg.ac.rs

¹ Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića No. 12, 34 000 Kragujevac, Republic of Serbia

Changes in Antioxidant Enzyme Activity in Response to Salinity-induced Oxidative Stress during Early Growth of Sweet Basil

Dragana Z. Jakovljević*, Marina D. Topuzović, Milan S. Stanković, Biljana M. Bojović

University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology,
Radoja Domanovića No. 12, 34 000 Kragujevac, Republic of Serbia

*Corresponding author: draganaj@kg.ac.rs

Received June 7, 2016 / Revised December 11, 2016 / Accepted December 19, 2016
© Korean Society for Horticultural Science and Springer 2017

Abstract. Sweet basil is one of the most widely used commercially cultivated plants worldwide. Here, we investigated the early growth and antioxidant enzyme activity of salt-stressed sweet basil seedlings. We subjected in vitro-grown sweet basil (*Ocimum basilicum* L. var. *minimum*) to different levels of sodium chloride (0, 10, 20 and 30 mM) and collected data per week during the first month of growth. The responses of antioxidant enzymes to salt stress were variable. Superoxide dismutase (SOD) exhibited similar patterns of increasing and decreasing activity in both shoots and root. By contrast, pyrogallol peroxidase (PPOX) and guaiacol peroxidase (GPOX) activity increased during plant growth but varied among seedling parts. Catalase (CAT) was the most salinity-sensitive enzyme examined, with activities varying depending on the plant part and stage of development. Our results also suggest that nutrient uptake is inhibited in basil under salt stress and that antioxidative defence mechanisms are induced in salinity-stressed sweet basil during early development. The changes in nonspecific antioxidant biomarkers observed in this study could be highly valuable for studying the mechanism underlying stress tolerance in *O. basilicum* L. var. *minimum* and could facilitate the development of tolerant basil cultivars.

Additional key words: catalase, development, *Ocimum basilicum*, peroxidase, superoxide dismutase

Introduction

Plant metabolism is highly regulated to maximize the efficiency of biosynthetic pathways. Since this regulatory mechanism does not completely prevent the production of reactive oxygen species (ROS), ROS are inevitable by-products of normal metabolism. In many cases, ROS production is genetically programmed and is induced during the course of development, with complex effects on both primary and secondary metabolism. Under optimum growing conditions, plants maintain a delicate balance between the production and scavenging of ROS. However, beginning in early development, metabolic activity varies dramatically and therefore, the sources of ROS are difficult to predict. Furthermore, such equilibrium might be disturbed by exposure to various stress conditions, which lead to an increase in ROS levels (Foyer and Noctor, 2005; Hussain et al., 2016). To alleviate ROS-mediated oxidative damage, plants have developed an antioxidant defence system involving non-enzymatic antioxidants (tocopherol, carotenoids, flavonoids and so on), as well as

antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) (Gengmao et al., 2015; Wei et al., 2015). However, the effectiveness of protective mechanism varies among species and varieties (Srinien et al., 2015).

Ocimum basilicum L., commonly known as sweet basil (the “king of the herbs”), is an annual herbaceous aromatic plant that is cultivated commercially worldwide. The biological properties of basil are well documented, with most investigations to date focused on the content and composition of essential oils (Lee et al., 2005; Politeo et al., 2007; Hussain et al., 2008). Although traditionally used as a medicinal herb to treat various conditions, basil has a long history as a culinary herb due to its foliage, which adds a distinctive flavour to many foods (Labra et al., 2004). Basil is popular among consumers year-round and controlled environmental conditions enabling stable production worldwide (Park et al., 2016). Therefore, while most commercial basil is of the *O. basilicum* species, there is great diversity among individual plants and plant populations, making the levels of

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, **Драгана Јаковљевић**, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

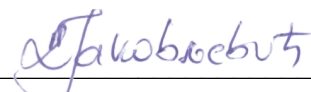
Интраспецијска варијабилност примарног и секундарног метаболизма нутритивно депривираних клијанаца врсте *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae)

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету** Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 17.04.2018. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, **Драгана Јаковљевић**

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Интраспецијска варијабилност примарног и секундарног метаболизма нутритивно депривираних клијанаца врсте *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae)

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету** Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒

дозвољавам

☐

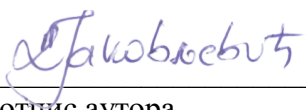
не дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

¹Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- (5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима**
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 17.04.2018. године



потпис аутора

²Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

²Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>