

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Dijana T. Smailagić

**Efekat floretina kao potencijalnog
bioherbicida na fiziološke procese kod model
– biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Dijana T. Smailagić

**The effect of phloretin as a potential
bioherbicide on physiological processes in
the model plant *Arabidopsis thaliana* (L.)
Heynh.**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentori:

dr Mariana Stanišić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Aneta Sabovljević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu,
Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Tijana Cvetić-Antić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu,
Biološki fakultet

dr Milorad Vujičić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu,
Biološki fakultet

dr Jelena Dragišić Maksimović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu,
Institut za multidisciplinarna istraživanja
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Slavica Dmitrović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Milena Trajković, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama odeljenja za fiziologiju biljaka na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Istraživanja su finansirana od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija u okviru projektnih zadataka definisanih Ugovorom IBISS-a i resornog ministarstva.

Prvo bih se zahvalila svojoj mentorki dr Mariani Stanišić na nesebičnom deljenju znanja, strpljenju i trudu da se rad podigne na najviši nivo od početka do kraja mojih doktorskih studija. Zahvaljujem se direktorki dr Mirjani Mihailović i rukovodiocu odeljenja za fiziologiju biljaka, dr Slavici Ninković, na obezbeđivanju uslova rada. Hvala dr Stevanu Avramovu na motivaciji da upišem doktorske studije. Veliko hvala dr Dušici Čalić na uvođenju u kolektiv i sklapanju kontakata sa širokim krugom saradnika iz struke i srodnih nauka, kao i sa predstavnicima privrede, i na saradnji prilikom izvođenja histoloških analiza. Hvala Nabilu Galawanjiju na uzgoju Arabidopsis thaliana u staklenoj bašti radi dobijanja semena za eksperimente. Hvala dr Milici Bogdanović na analizama distribucije auksina pomoću fluorescentne mikroskopije. Takođe se zahvaljujem dr Branki Vinterhalter, dr Neveni Banjac, dr Mileni Trajković, dr Slavici Dmitrović, dr Sofiji Stupar i Milici Đorđić na podršci i saradnji.

Veliko hvala dr Vuku Maksimoviću i dr Jeleni Dragišić Maksimović sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja – Instituta od nacionalnog značaja, koji su rukovodili biohemijskim istraživanjima koja su oplemenila ovu doktorsku disertaciju. Rezultati HPLC analize metabolizma floretina, kojom je rukovodio Vuk, doprineli su razumevanju metabolizma egzogenog floretina u biljnim tkivima, što je veoma značajno postignuće. Jelena je rukovodila analizama enzima i antioksidativne aktivnosti uzoraka biljnih tkiva na spektrofotometru, čime su razjašnjeni mehanizmi delovanja floretina. Posebnu zahvalnost dugujem dr Branki Živanović sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja – Instituta od nacionalnog značaja, na elektrofiziološkim merenjima. Hvala dr Jeleni Penjišević sa Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Instituta od nacionalnog značaja, na uvođenju u enzimsku kinetiku. Zahvaljujem se prof. dr Relji Suručiću sa Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci na analizama molekulskog dokinga i molekulske dinamike. Hvala dr Alešu Pěnčíku i njegovim saradnicima iz Instituta za eksperimentalnu botaniku (Olomouc, Češka Republika) na analizama metaboloma auksina.

Zahvaljujem se profesorki dr Aneti Sabovljević na podršci i usmeravanju kroz studije. Takođe se zahvaljujem i prof. dr Tijani Cvetić-Antić, prof. dr Velemiru Ninkoviću i ostalim profesorima čije sam predmete pohađala i koji su doprineli mom formiranju kao stručnjaka. Hvala profesorki dr Mariji Marin na snimanju uzoraka biljnih ćelija pod transmisionim elektronskim mikroskopom i na tumačenju mikrografija. Posebno se zahvaljujem profesoru dr Miloradu Vujičiću koji je pokazao veliko interesovanje za moju istraživačku temu.

Zahvaljujem se svojoj porodici i prijateljima na podršci tokom doktorskih studija.

Efekat floretina kao potencijalnog bioherbicida na fiziološke procese kod model – biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Sažetak:

Primena sintetičkih herbicida u zaštiti useva nosi značajne ekološke rizike i doprinosi razvoju rezistencije korova. Evropska unija ulaže znatne napore u cilju smanjenja upotrebe pesticida i pronalaženja održivih rešenja, kao što je razvoj ekološki bezbednih bioherbicida. Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju pionirski doprinos razumevanju fitotoksičnog potencijala floretina i mehanizama njegovog delovanja kod model-biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., u kontekstu njegove potencijalne primene u razvoju bioherbicida. Analize ukazuju na to da floretin deluje kao multimodalni inhibitor, indukujući kaskadu morfoloških, fizioloških, metaboličkih i ultrastrukturnih promena. Njegovo delovanje obuhvata narušavanje homeostaze auksina, sa posledičnom akumulacijom i nepravilnom distribucijom u vršnim delovima korena, što dovodi do inhibicije razvoja korenovog sistema, gubitka gravitropskog odgovora i morfoloških deformacija. Istovremeno, oštećenje strukture i funkcije hloroplasta uzrokuje iscrpljivanje skrobnih rezervi i metaboličko „gladovanje”, čime se pokreću procesi mikro- i makroautofagije i programirane ćelijske smrti. Floretin takođe deluje i kao inhibitor aktivnosti antioksidativnih enzima, katalaze i peroksidaze, kroz direktnu interakciju sa aktivnim centrom, odnosno NADP(H) regijom enzima, sa kojima ostvaruje dugotrajne i stabilne interakcije putem vodoničnih i hidrofobnih veza. Egzogeno primenjen floretin se efikasno usvaja i inicira rane detoksikacione mehanizme putem intenzivne glikozilacije, čime se transformiše u konjugovane oblike podložne daljoj metaboličkoj obradi. Međutim, rezultati analiza ukazuju na to da uprkos intenzivnom metabolizmu floretina, ovi procesi nisu dovoljni za efikasnu neutralizaciju njegovog fitotoksičnog delovanja kod *A. thaliana*.

Ključne reči: auksini, depolarizacija ćelijske membrane, dihidrohalkoni, enzimska inhibicija, fitotoksičnost, glikozilacija, gravitropizam, inhibicija rastenja, mikro- i makro autofagija, oštećenje hloroplasta.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

The Effect of Phloretin as a Potential Bioherbicide on Physiological Processes in the Model Plant *Arabidopsis Thaliana* (L.) Heynh.

Abstract:

The use of synthetic herbicides poses significant ecological risks and contributes to the development of weed resistance. The European Union is promoting sustainable strategies to reduce pesticide use, such as development of environmentally friendly bioherbicides. This doctoral dissertation makes a pioneering contribution to understanding the phytotoxic potential of phloretin and its mechanisms of action in the model plant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., in the context of its potential application in bioherbicide development. Analyses show that phloretin acts as a multimodal inhibitor, inducing a cascade of morphological, physiological, metabolic, and ultrastructural changes. Its action includes disruption of auxin homeostasis, and its accumulation and irregular distribution in the apical region of the roots, which results in inhibited root development, loss of gravitropic response, and morphological abnormalities. At the same time, impairment of chloroplast structure and function results in the depletion of starch reserves and metabolic starvation, thereby triggering micro- and macroautophagy pathways, and ultimately leading to programmed cell death. Phloretin also inhibits catalase and peroxidase activity through direct interaction with the active centre or NADP(H)-binding region of the enzyme, forming stable and long-lasting interactions via hydrogen and hydrophobic bonds. Exogenously applied phloretin is efficiently absorbed within plant tissues where initiates early detoxification responses through intensive glycosylation, yielding conjugates amenable to further metabolic processing. However, the results indicate that, despite extensive metabolism, these processes are insufficient to effectively mitigate the phytotoxic effects of phloretin in *A. thaliana*.

Keywords: auxins, cell membrane depolarization, chloroplast damage, dihydrochalcones, enzyme inhibition, glycosylation, gravitropism, growth inhibition, micro- and macroautophagy, phytotoxicity.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Plant physiology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. IZAZOVI U SUZBIJANJU KOROVA	1
1.1.1. Početak ere sintetičkih herbicida: uloga auksinskih analoga	1
1.1.2. Savremeni pristupi klasifikaciji sintetičkih herbicida	2
1.1.3. Ograničenja i posledice primene sintetičkih herbicida: potreba za održivim i ekološkim rešenjima	3
1.1.4. Bioherbicidi kao održiva alternativa sintetičkim sredstvima za suzbijanje korova	5
1.1.5. Halkoni kao molekulska osnova za razvoj bioherbicida	8
1.2. FLORETIN	10
1.2.1. Fitotoksični potencijal floretina: pregled postojećih studija	13
1.3. AUKSINI: BIOSINTEZA, TRANSPORT I FIZIOLOŠKE FUNKCIJE U RASTENJU I RAZVIĆU BILJAKA	14
1.3.1. Biosinteza auksina	15
1.3.1.1. Put triptamina	15
1.3.1.2. Put indol-3-piruvata	15
1.3.1.3. Put indol-3-acetamida	16
1.3.1.4. Put indol-3-acetaldoksima	16
1.3.1.5. Biosintetski putevi auksina nezavisni od triptofana	17
1.3.2. Metabolizam auksina	17
1.3.3. Polarni transport auksina	18
1.3.4. Prenos auksinskih signala u ćeliji	20
1.3.5. Uloga auksina u regulaciji rastanja i razvića biljaka	21
1.3.5.1. Auksini i njihova funkcija u fiziologiji klijanja	21
1.3.5.2. Uloga auksina u razvoju korenovog sistema	22
1.3.5.3. Uloga auksina u razvoju nadzemnih organa biljaka	23
1.4. REAKCIJE BILJAKA NA STRES	24
1.4.1. Oksidativni stres	25
1.4.2. Neenzimske komponente antioksidativnog sistema biljaka	25
1.4.2.1. Fenolna jedinjenja	25
1.4.2.2. Askorbinska kiselina	27
1.4.2.3. Glutation	28
1.4.2.4. Prolin	28
1.4.2.5. Tokoferoli	29
1.4.2.6. Karotenoidi	30
1.4.3. Enzimske komponente antioksidativnog sistema biljaka	31
1.4.3.1. Superoksid-dismutaze	31
1.4.3.2. Katalaze	32
1.4.3.3. Peroksidaze	33
2. CILJEVI RADA	35
3. MATERIJAL I METODE	36
3.1. BILJNI MATERIJAL I USLOVI GAJENJA <i>in vitro</i>	36
3.1.1. Gajenje biljaka <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh radi prikupljanja semena	36

3.1.2. Priprema hranljivih podloga i laboratorijskog pribora za rad u kulturi <i>in vitro</i>	37
3.1.3. Sterilizacija semena <i>A. thaliana</i> i uslovi gajenja <i>in vitro</i>	38
3.2. MORFOMETRIJSKA KARAKTERIZACIJA JUVENILNIH BILJAKA	39
3.2.1. Analiza uticaja floretina na klijanje i morfološke parametre juvenilnih biljaka	39
3.2.1.1. Analiza podataka	41
3.3. ELEKTROFIZIOLOŠKA ANALIZA EFEKTA FLORETINA NA EPIDERMALNE ĆELIJE KORENA	42
3.3.1. Postupak elektrofiziološkog merenja	42
3.3.2. Ispitivanje efekta floretina na membranski potencijal korena	44
3.4. HISTOLOŠKA ANALIZA KORENA JUVENILNIH BILJAKA	44
3.4.1. Analiza histološke organizacije primarnog korena	44
3.4.2. Određivanje veličine i distribucije amiloplasta u ćelijama kolumele	44
3.5. ANALIZA ULTRASTRUKTURNIH KARAKTERISTIKA MEZOFILNIH ĆELIJA	45
3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FOTOSINTETSKIH PIGMENATA	46
3.6.1. Priprema uzoraka i postupak ekstrakcije	46
3.6.2. Spektrofotometrijska analiza	46
3.6.2.1. Analiza podataka	46
3.7. ANALIZA SADRŽAJA I DISTRIBUCIJE AUKSINA	47
3.7.1. Kvantitativna analiza auksina i auksinskih metabolita	47
3.7.1.1. Analiza podataka	49
3.7.2. Analiza distribucije auksina u primarnom korenu juvenilnih biljaka	49
3.7.2.1. Analiza podataka	50
3.8. ANALIZA ANTIOKSIDATIVNOG STATUSA JUVENILNIH BILJAKA	50
3.8.1. Analiza neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema	51
3.8.1.1. Priprema metanolnih ekstrakata	51
3.8.1.2. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata juvenilnih biljaka i metanolnih rastvora floretina	51
3.8.1.3. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima juvenilnih biljaka	52
3.8.1.4. Određivanje sadržaja malondialdehida	52
3.8.1.5. Određivanje sadržaja prolina	53
3.8.1.6. Određivanje sadržaja vodonik-peroksida	53
3.8.2. Analiza enzimskih komponenti antioksidativnog sistema	54
3.8.2.1. Izolacija ukupnih solubilnih proteina	54
3.8.2.2. Bradfordov esej kvantifikacije proteina	55
3.8.2.3. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima primenom spektrofotometrijskih analiza	55
3.8.2.3.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza	55
3.8.2.3.2. Određivanje aktivnosti katalaza	56
3.8.2.3.3. Određivanje aktivnosti peroksidaza	57
3.8.2.3.4. Analiza podataka	57
3.8.3. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima primenom native gel-elektroforeze	58
3.8.3.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza	59
3.8.3.2. Određivanje aktivnosti katalaza	59
3.8.3.3. Određivanje aktivnosti peroksidaza	60

3.9. ANALIZA EFEKTA FLORETINA NA INHIBICIJU ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE I PEROKSIDAZE	60
3.9.1. <i>In vitro</i> analiza enzimske inhibicije	61
3.9.1.1. Spektrofotometrijski eseji za analizu enzimske aktivnosti	61
3.9.1.2. Izbor rastvarača za pripremu matičnog rastvora floretina	62
3.9.1.3. Određivanje srednje inhibitorne koncentracije floretina	62
3.9.1.4. Analiza kinetike enzimske inhibicije	63
3.9.1.5. Vizuelizacija inhibicije enzimske aktivnosti CAT i HRP primenom native gel-elektroforeze	64
3.9.2. <i>In silico</i> analiza enzimske inhibicije	65
3.9.2.1. Molekulski doking	65
3.9.2.1.1. Priprema proteina i liganda	65
3.9.2.1.2. Blind docking pristup	65
3.9.2.1.3. Softver i parametri za doking	66
3.9.2.1.4. Rangiranje i analiza rezultata	66
3.9.2.2. Simulacije molekulske dinamike	66
3.9.2.2.1. Priprema sistema	66
3.9.2.2.2. Parametri sila polja	68
3.9.2.2.3. Protokol simulacije	68
3.9.2.2.4. Metode analize	69
3.10. ANALIZA STABILNOSTI FLORETINA U HRANLJIVIM PODLOGAMA	69
3.10.1. Prikupljanje i priprema uzoraka	69
3.10.2. Spektrofotometrijska analiza	69
3.11. ANALIZA SADRŽAJA FLORETINA I NJEGOVIH DERIVATA U JUVENILNIM BILJKAMA	70
3.11.1. Gajenje juvenilnih biljaka i priprema metanolnih ekstrakata	70
3.11.2. Kvantifikacija floretina i njegovih derivata primenom HPLC/MS analize	70
4. REZULTATI	72
4.1. UTICAJ FLORETINA NA RASTENJE, RAZVIĆE I MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE JUVENILNIH BILJAKA	72
4.1.1. Analiza uticaja floretina na klijanje i morfološke parametre juvenilnih biljaka u kulturi <i>in vitro</i> u prisustvu saharoze i mio-inozitola	72
4.1.1.1. Uticaj floretina na klijanje semena	72
4.1.1.2. Uticaj floretina na izduživanje primarnog korena	73
4.1.1.3. Uticaj floretina na formiranje bočnih korenova	75
4.1.1.4. Uticaj floretina na formiranje adventivnih korenova	77
4.1.1.5. Uticaj floretina na rastenje i razviće izdanaka	77
4.1.2. Analiza uticaja floretina na morfološke parametre juvenilnih biljaka u kulturi <i>in vitro</i> u odsustvu saharoze i mio-inozitola	78
4.1.2.1. Uticaj floretina na izduživanje i morfološke karakteristike primarnog korena	78
4.1.2.2. Uticaj floretina na formiranje bočnih korenova	79
4.1.2.3. Uticaj floretina na formiranje adventivnih korenova	79
4.1.2.4. Uticaj floretina na rastenje izdanaka	81
4.1.2.5. Uticaj produženog tretmana floretinom na morfološke karakteristike juvenilnih biljaka	81

4.1.3. Uticaj floretina na rastenje i prirast mase juvenilnih biljaka tretiranih posredstvom korena	82
4.1.4. Uticaj floretina na gravitropski odgovor i indukciju razvojnih deformacija	84
4.2. ELEKTROFIZIOLOŠKA ANALIZA EFEKTA FLORETINA NA EPIDERMALNE ĆELIJE KORENA	87
4.3. ANALIZA HISTOLOŠKE ORGANIZACIJE KORENA JUVENILNIH BILJAKA	88
4.3.1. Uticaj floretina na histološku organizaciju primarnog korena	88
4.3.2. Uticaj floretina na veličinu i distribuciju amiloplasta u ćelijama kolumele	90
4.4. ANALIZA ULTRASTRUKTURNIH KARAKTERISTIKA MEZOFILNIH ĆELIJA JUVENILNIH BILJAKA	91
4.4.1. Ultrastrukturne promene mezofilnih ćelija nakon 10 dana tretmana floretinom	91
4.4.2. Ultrastrukturne promene mezofilnih ćelija nakon 28 dana tretmana floretinom	93
4.5. UTICAJ FLORETINA NA KONCENTRACIJU FOTOSINTETSKIH PIGMENATA	95
4.6. UTICAJ FLORETINA NA SADRŽAJ I DISTRIBUCIJU AUKSINA	97
4.6.1. Uticaj floretina na sadržaj auksina i auksinskih metabolita	97
4.6.2. Uticaj floretina na distribuciju auksina u vrhovima korena	99
4.7. UTICAJ FLORETINA NA ANTIOKSIDATIVNI STATUS JUVENILNIH BILJAKA	102
4.7.1. Uticaj floretina na neenzimske komponente antioksidativnog sistema	102
4.7.1.1. Efekat floretina na ukupnu antioksidativnu aktivnost i sadržaj fenolnih jedinjenja juvenilnih biljaka	102
4.7.1.2. Antioksidativna aktivnost metanolnih rastvora floretina	102
4.7.1.3. Efekat floretina na sadržaj malodjaldehida, vodonik-peroksida i prolina	103
4.7.2. Uticaj floretina na enzimске komponente antioksidativnog sistema	104
4.8. ANALIZA EFEKTA FLORETINA NA INHIBICIJU ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE I PEROKSIDAZE	106
4.8.1. <i>In vitro</i> analiza enzimске inhibicije katalaze i peroksidaze	106
4.8.1.1. Izbor rastvarača	106
4.8.1.2. Analiza enzimске inhibicije katalaze u prisustvu floretina	107
4.8.1.3. Analiza enzimске inhibicije peroksidaze u prisustvu floretina	109
4.8.2. <i>In silico</i> analize interakcija floretina sa katalazom i peroksidazom	112
4.8.2.1. Analiza molekulskog dokinga	112
4.8.2.1.1. Interakcija floretina sa katalazom	112
4.8.2.1.2. Interakcija floretina sa peroksidazom	114
4.8.2.2. Analiza simulacija molekulске dinamike	115
4.8.2.2.1. Analiza ukupne potencijalne energije	115
4.8.2.2.2. Analiza srednjeg kvadratnog odstupanja (RMSD)	116
4.8.2.2.3. Analiza srednjeg kvadratnog kolebanja (RMSF)	118
4.8.2.2.4. Analiza radijusa giracije	120
4.8.2.2.5. Analiza ostvarenih veza	121
4.9. ANALIZA STABILNOSTI FLORETINA U HRANLJIVIM PODLOGAMA	122
4.10. ANALIZA SADRŽAJA FLORETINA I NJегоVIH DERIVATA U JUVENILNIM BILJKAMA	124
5. DISKUSIJA	131
5.1. UTICAJ FLORETINA NA RASTENJE, RAZVIĆE I MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE JUVENILNIH BILJAKA	131
5.1.1. Uticaj floretina na klijanje semena	132

5.1.2. Uticaj floretina na morfološke parametre juvenilnih biljaka gajenih na hranljivim podlogama u prisustvu saharoze i mio-inozitola	132
5.1.3. Uticaj floretina na morfološke parametre juvenilnih biljaka gajenih na hranljivim podlogama bez saharoze i mio-inozitola	135
5.1.4. Uticaj floretina na rastenje i prirast mase juvenilnih biljaka tretiranih posredstvom korena	136
5.1.5. Uticaj floretina na gravitropski odgovor	138
5.2. ELEKTROFIZIOLOŠKA ANALIZA EFEKTA FLORETINA NA EPIDERMALNE ĆELIJE KORENA	139
5.3. ANALIZA HISTOLOŠKIH PROMENA NA KORENU JUVENILNIH BILJAKA IZAZVANIH FLORETINOM	141
5.3.1. Efekat floretina na histološku organizaciju korena	141
5.3.2. Efekat floretina na veličinu i distribuciju amiloplasta u ćelijama kolumele	142
5.4. ANALIZA PROMENA U ULTRASTRUKTURI MEZOFILNIH ĆELIJA LISTOVA <i>A. thaliana</i> IZAZVANIH FLORETINOM	143
5.5. UTICAJ FLORETINA NA KONCENTRACIJU FOTOSINTETSKIH PIGMENATA ...	147
5.6. UTICAJ FLORETINA NA SADRŽAJ I DISTRIBUCIJU AUKSINA	148
5.6.1. Uticaj floretina na sadržaj auksina i auksinskih metabolita	148
5.6.2. Uticaj floretina na distribuciju auksina u vrhovima korena	150
5.7. UTICAJ FLORETINA NA ANTIOKSIDATIVNI STATUS JUVENILNIH BILJAKA..	152
5.8. ANALIZA INHIBICIJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE I PEROKSIDAZE FLORETINOM	154
5.9. ANALIZA STABILNOSTI FLORETINA U HRANLJIVIM PODLOGAMA	158
5.10. ANALIZA SADRŽAJA FLORETINA I NJEGOVIH DERIVATA U JUVENILNIM BILJKAMA	159
5.11. PREDLOŽEN NAČIN DELOVANJA FLORETINA KOD <i>A. thaliana</i>	161
5.12. PREDLOZI ZA BUDUĆI RAD I UPOTREBU FLORETINA	163
6. ZAKLJUČAK	166
7. LITERATURA	168
BIOGRAFIJA AUTORA	213
Prilog 1 - Izjava o autorstvu	214
Prilog 2 - Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	215
Prilog 3 - Izjava o korišćenju	216

SKRAĆENICE

2,4,5-T	2,4,5-trihlorofenoksisirćetna kiselina
2,4-D	2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina
2,4-DP	dihloroprop
ABA	abscisinska kiselina
ABC	ATP-vezujuća kasetna (eng. ATP-BINDING CASSETTE)
ABCB	eng. ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B TRANSPORTER
ABCC	eng. ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY C TRANSPORTER
ABP	AUXIN BINDING PROTEIN
ACC	1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina
AFB	eng. AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN
AM1	eng. <i>Austin Model 1</i>
AMPK	eng. <i>AMP-dependent protein kinase</i>
ANT	antranilat
ARD	bolest presađivanja jabuke (eng. <i>Apple Replant Disease</i>)
ARE	elementi osetljivi na auksin (eng. <i>auxin response elements</i>)
ARF	eng. AUXIN RESPONSE FACTOR
AsA	askorbinska kiselina (vitamin C), eng. <i>ascorbic acid</i>
At5PTaza13	eng. INOSITOL POLYPHOSPHATE 5-PHOSPHATASE
AUX1/LAX	eng. AUXIN RESISTANT1/LIKE AUXIN RESISTANT
AuxRE elementi	eng. <i>auxin responsive elements</i>
BCC	eng. <i>bond charge correction</i>
BOA	benzoksazin-2(3H)-on
BSIM	bez saharoze i mio-inozitola
BSM	elektrofiziološki rastvor (eng. <i>basic salt medium</i>)
bZIP11	eng. BASIC LEUCINE-ZIPPER 11
CAT	katalaze
CDK	ciklin-zavisne kinaze
CYC	ciklin
CYP79B2	citohrom P450 monooksigenaze
CYP79B3	citohrom P450 monooksigenaze
DAO1	eng. DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1
DIBOA	2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-onu
DIMBOA	2,4-dihidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on
DMSO	dimetil-sulfoksid
E2Fa	eng. E2 PROMOTER BINDING FACTOR A
E2Fb	eng. E2 PROMOTER BINDING FACTOR B
ES	enzim-supstrat kompleks
ESI	elektroaspršujuća jonizacija (eng. <i>electrospray ionization</i>)
EZ	elongaciona zona
F5	tretman floretinom nakon pet dana
F10	tretman floretinom nakon deset dana
Flt	floretin

Flz	florizin
FW	sveža masa biljnog tkiva (eng. <i>fresh weight</i>)
GA	galna kiselina (eng. <i>gallic acid</i>)
GAFF2	eng. <i>general AMBER force field 2</i>
GFP	zeleni fluorescentni protein (eng. <i>green fluorescent protein</i>)
GH3	eng. GRETSCHENHAGEN3
GSH	glutation
GSSG	oksidovani glutation
GST	glutation S-transferaza
HB	vodonične veze (eng. <i>hydrogen bonds</i>)
HPLC/MS	eng. <i>high performance liquid chromatography with mass spectrometry</i>
HRP	peroksidaza rena (eng. <i>horseradish peroxidase</i>)
Hyd	hidrofobni kontakti
IAA	indol-3-sirćetna kiselina (auksin), eng. <i>indole-3-acetic acid</i>
IAA3	eng. INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 3
IAA-Asp	IAA-aspartat
IAA-Glu	IAA-glutamat
IAAH	IAM-hidrolaza
IAAM	triptofan-2-monooksigenaza
IAH	indol-3-acetaldehid
IAM	indol-3-acetamid
IAN	indol-3-acetonitril
IAOx	indol-3-acetaldoksim
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
IBA	indol-buterna kiselina (eng. <i>indole-3-butyric acid</i>)
ILR1	IAA-Leu-Resistant1
Ion	jonske veze
IPC	N-fenil-izopropil-karbamat
IPyA	indol-3-piruvat
K5	kontrola nakon pet dana
K10	kontrola nakon deset dana
KEGG	eng. <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
MCPA	2-metil-4-hlorofenoksisirćetna kiselina
MCPB	(4-(4-hlor-o-toliloksi)buterna kiselina)
MCPP	mekoprop (metil-hlorfenoksi-propionska kiselina)
MDA	malondialdehid
MDHA	monodehidroaskorbat-radikal
MDR/PGP	eng. MULTIDRUG RESISTANCE/P-GLYCOPROTEIN
MRP/ABCC	eng. <i>multidrug resistance-associated protein</i>
MS	Murashige i Skoog
MZ	meristemska zona
NIT	nitrilaze
O ₂ ^{•-}	superoksid anjon radikal
PCAT	peroksidaze-katalaze
PCOX	peroksidaze-ciklooksigenaze

PIF TF	eng. PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PILS	eng. PIN-LIKES
PIN	eng. PIN-FORMED
PME	eng. <i>particle mesh ewald</i>
PNP	peroksidaze kikirikija (eng. <i>peanut peroxidase</i>)
POD	peroksidaze
PSI	fotosistem 1
PSII	fotosistem 2
QC	mirujući centar (eng. <i>quiescent center</i>)
REA	preostala enzimaska aktivnost (eng. <i>residual enzyme activity</i>)
RESP	eng. <i>restrained electrostatic potential</i>
RC	korenova kapa (eng. <i>root cap</i>)
Rg	radijus giracije
RMSD	srednje kvadratno odstupanje (eng. <i>root mean square deviation</i>)
RMSF	srednje kvadratno kolebanje (eng. <i>root mean square fluctuation</i>)
ROI	region od interesa (eng. <i>region of interest</i>)
ROP2	eng. RHO-RELATED PROTEIN 2
ROS	reaktivne kiseonične vrste (eng. <i>reactive oxygen species</i>)
SA	salicilna kiselina
SBP	peroksidaze soje (eng. <i>soybean peroxidase</i>)
SE	standardna greška (eng. <i>standard error</i>)
SHY2	eng. SHORT HYPOCOTYL 2
SIM	saharoza i mio-inozitol
SIR	parametri za detekciju odabranih molekula (eng. <i>selected ion recording</i>)
SMILES	eng. <i>simplified molecular input line entry system</i>
SnRK1	eng. SUCROSE-NON-FERMENTATION-RELATED PROTEIN KINASE1
SOD	superoksid-dismutaze
TAA1	L-triptofan-piruvat aminotransferaza (eng. <i>tryptophan aminotransferase of Arabidopsis 1</i>)
TAM	triptamin
TAR	triptofan-aminotransferaza
TBA	tiobarbiturinska kiselina (eng. <i>thiobarbituric acid</i>)
TCA	trihlorosirćetna kiselina (eng. <i>trichloroacetic acid</i>)
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija
TIP3P	eng. <i>transferable intermolecular potential 3-point</i>
TOR	eng. TARGET OF RAPAMYCIN
TRP	triptofan
UHPLC–MS/MS	eng. <i>ultra high performance liquid chromatography with mass spectrometry</i>
VGI	vertikalni gravitropski indeks

1. UVOD

1.1. IZAZOVI U SUZBIJANJU KOROVA

Štetni uticaj korovskih vrsta na prinos ključnih ratarskih i industrijskih kultura (pšenica, pirinač, kukuruz, krompir, soja i pamuk) predstavlja konstantan izazov za stabilnost poljoprivredne proizvodnje (Oerke, 2006). Na primeru proizvodnje pšenice u Severnoj Americi iz 2013–2014. godine, zabeležen je pad prinosa od 22% usled zakorovljenosti, uz procenu da bi bez hemijskog suzbijanja deficit bio veći od 35% (Berestetskiy, 2023). U Indiji, smanjenje prinosa pod uticajem korova je iznosilo: 36% za kikiriki, 31% za soju, 25% za kukuruz i 19% za pšenicu (Berestetskiy, 2023). Postoji oko 30 000 korovskih vrsta rasprostranjenih širom sveta, od kojih je 1 800 najinvazivnijih vrsta odgovorno za prosečno godišnje smanjenje prinosa od 9,7% u ukupnoj poljoprivrednoj proizvodnji (Li i sar., 2003). Korovi izazivaju štetu u poljoprivrednim kulturama na više načina: kompeticijom za resurse kao što su svetlost, voda, hranljive materije i prostor (Penariol i sar., 2008); zatim direktnom inhibicijom rastenja i razvića gajenih vrsta putem izlučivanja alelohemikalija (Klaic i sar., 2015), ili posredno, privlačenjem štetočina i patogena koji se zatim prenose sa korova na poljoprivredne kulture. Korovi takođe utiču na kvalitet prinosa i povećavaju troškove pripreme zemljišta za setvu ili proces žetve (Klaic i sar., 2015). Osim pomenutih troškova, najveći deo novčanih sredstava izdvaja se za hemijsku zaštitu useva od korovskih vrsta. Prema najnovijim podacima, globalno tržište herbicida imalo je u periodu 2023-2024. godine vrednost od približno 34-39,5 milijardi dolara, dok su sintetički herbicidi činili 45-50% svetske potrošnje agrohemijskih sredstava (IMARC Group, 2023; FAO, 2024; Grand View Research, 2024).

Prema statističkim procenama, u Srbiji je potrošeno ukupno 966 tona herbicida tokom 2020. godine. U narednim godinama primećeno je smanjenje upotrebe herbicida, pa je tako u 2021. godini potrošeno približno 875 tona, u 2022. godini 885 tona, a u 2023. godini 871 tona (FAO, 2025). U budućnosti se očekuje da primena herbicida bude još manja.

1.1.1. Početak ere sintetičkih herbicida: uloga auksinskih analoga

Industrija sintetičkih herbicida počinje da se razvija krajem XIX i početkom XX veka. *Sinox* (natrijum-dinitrocresilat), prvi organski hemijski herbicid, razvijen je u Francuskoj 1933. godine (Mesnage i sar., 2021; Chauvel i sar., 2022). Korišćen je za suzbijanje širokolisnih korova u usevima žitarica, graška, kukuruza, lana, belog i crnog luka (Holm i Johnson, 2009). U kasnim četrdesetim godinama XX veka, razvijeni su novi herbicidi na osnovu istraživanja koja su obavljana tokom Drugog svetskog rata (Vats, 2015). U periodu od narednih 20 godina formulisano je i komercijalizovano preko 100 novih sintetičkih herbicida. Među prvim selektivnim herbicidima se izdvajaju 2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4-D), 2,4,5-trihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4,5-T), 2-metil-4-hlorofenoksisirćetna kiselina (MCPA) i N-fenil-izopropil-karbamat (IPC) (Baldwin, 1953; Holm i Johnson, 2009; Chauvel i sar., 2022). 2,4-D, 2,4,5-T i MCPA spadaju u auksinske herbicide, čiji je mehanizam delovanja zasnovan na imitiranju prirodnih auksina i ometanju metabolizma ovog važnog fitohormona. Navedeni auksinski herbicidi primenjuju se folijarno protiv širokolisnih korova. 2,4-D je prvi sintetisan auksinski herbicid, koji je našao primenu u kontroli širokolisnih korova kao što su poljska gorušica (*Sinapis arvensis* L.), pepeljuga (*Chenopodium album* L.), kravlja stisnuša

(*Thlaspi arvense* L.), mišjakinja (*Stellaria media* (L.) Vill.), boca (*Xanthium strumarium* L.) i iva (*Iva xanthiifolia* Nutt.) (Holm i Johnson, 2009). Uprkos širokoj upotrebi, 2,4-D nije bio uspешan u tretiranju svih korovskih vrsta podjednako. Pojava rezistencije kod korovskih vrsta kao što su njivski vijušac (*Fallopia convolvulus* (L.) Á. Löve) i tušt (*Portulaca oleracea* L.), kao i nedovoljna efikasnost kod nekih drugih korovskih vrsta (Holm i Johnson, 2009), dovela je do potrebe za sintetisanjem novih herbicida. Takođe, mnoge gajene kulture, među kojima su ovas i mahunarke, pokazale su osjetljivost na tretman sa 2,4-D (Holm i Johnson, 2009). Taj problem je rešen uvođenjem drugih auksinskih herbicida kao što su MCPA, odnosno 4-(4-hlor-o-toliloksi)buterna kiselina (MCPB), mekoprop (metil-hlorfenoksi-propionska kiselina, MCPP), dihlorprop (2-(2,4-diklorfenoksi)propionska kiselina, 2,4-DP) i 2,4,5-T i njihovim kombinovanjem sa 2,4-D (Holm i Johnson, 2009).

Od sredine osamdesetih godina XX veka, određene poljoprivredne kulture su genetički modifikovane radi postizanja otpornosti na specifične sintetičke herbicide (Owen i Zelaya, 2005; Bonny, 2016). U komercijalnoj proizvodnji, ova modifikacija je primenjena prvenstveno na ekonomski najznačajnijim ratarskim kulturama, među kojima dominiraju soja (*Glycine max* (L.) Merr.), kukuruz (*Zea mays* L.), pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) i uljana repica (*Brassica napus*), dok su u manjoj meri zastupljene šećerna repa (*Beta vulgaris* L.) i lucerka (*Medicago sativa* L.). Tako dobijeni genetički modifikovani organizmi poznati kao usevi otporni na herbicide (eng. *herbicide resistant crops*) omogućili su efikasnu hemijsku kontrolu korova, jer su mogli da prežive na poljima tretiranim odgovarajućim herbicidom, poput glifosata, glufosinat-amonijuma ili dikambe. Takvi usevi su bili posebno značajni za setvu bez prethodnog mehaničkog uklanjanja korova, što se činilo kao dobro rešenje za sprečavanje erozije zemljišta koje se javlja kao posledica odsustva biljaka u zemljištu. Međutim, s obzirom na to da ovi usevi zahtevaju povećanu primenu sintetičkih herbicida (Bonny, 2016), ostaje diskutabilan njihov uticaj na životnu sredinu i zdravlje ljudi i životinja. Pored toga, u ovakvim usevima se javlja povećan rizik od pojave rezistencije (Bonny, 2016), pa je potrebno primeniti više različitih strategija za kontrolu korova.

1.1.2. Savremeni pristupi klasifikaciji sintetičkih herbicida

Klasifikacija savremenih sintetičkih herbicida može se izvršiti na osnovu nekoliko kriterijuma. Na osnovu selektivnosti, herbicidi su grupisani u dve grupe: totalne i selektivne herbicide. Totalni herbicidi deluju fitotoksično na sve biljne vrste, dok selektivni deluju inhibitorno na klijanje, rastenje ili razviće samo određenih biljnih vrsta. Na osnovu morfoloških i anatomskih osobina biljaka na koje deluju, herbicidi se mogu podeliti na sredstva protiv širokolisnih (dikotiledonih) i uskolisnih (monokotiledonih) korova. Prema načinu delovanja, herbicidi se svrstavaju u kontaktne i sistemske (translokacione) herbicide. Kontaktne herbicidi (npr. dikvat (1,1'-etilen-2,2'-dipiridin), parakvat (1,1'-dimetil-4,4'-dipiridin) i bentazon (3-(izopropil)-1H-2,1,3-benzotiadiazin-4(3H)-on 2,2-dioksid)) se apsorbuju preko listova i deluju isključivo na biljne organe sa kojima su direktno u kontaktu. Ovi herbicidi su efikasni pre svega u slučaju mladih, jednogodišnjih korova. Sistemski herbicidi, kao što su amitrol (3-amino-1,2,4-triazol), pikloram (4-amino-3,5,6-trihloropiridin-2-karboksilna kiselina), 2,4-D i glufosinat-amonijum, prodiru preko listova u unutrašnjost biljke sve do korena i drugih podzemnih organa kao što su, npr. rizomi, i delotvorni su protiv višegodišnjih korova sa razvijenim korenovim sistemom (Šarić, 1990; Zimdahl i Basinger, 2024).

U pogledu vremena primene, herbicidi se klasifikuju kao sredstva koja se primenjuju pre setve, posle setve a pre nicanja (eng. *pre-emergence*) ili posle nicanja useva (eng. *post-emergence*). Herbicidi koji se primenjuju pre setve (često uz inkorporaciju u zemljište) uništavaju korove u fazi klijanja i nicanja, pre nego što glavna kultura bude zasejana. Druga grupa se primenjuje neposredno nakon setve, a pre nego što usev nikne, dok se treća grupa koristi folijarno, nakon nicanja i useva i korova. Optimalno vreme primene herbicida direktno zavisi od biologije i tolerancije vrste koja se uzgaja. Herbicidi koji se primenjuju pre setve ili nicanja igraju ključnu ulogu u širokorednim usevima, gde rana pojava korova može ozbiljno da ugrozi početni razvoj gajenih biljaka. Herbicidi koji se primenjuju pre setve ili nicanja igraju ključnu ulogu u širokorednim usevima, gde rana pojava korova može ozbiljno da ugrozi početni razvoj gajenih biljaka. Oni se često primenjuju za suzbijanje korova kod kukuruza, soje, pamuka i šećerne trske (Iqbal i sar., 2020; Krähmer i sar., 2021). Kod useva koji tolerišu ranu konkurenciju korova, kao što je soja, tretiranje herbicidima može da se obavi i kasnije, nakon nicanja (Krähmer i sar., 2021).

Prema najnovijoj klasifikaciji (HRAC Global, 2024), navedeni su sledeći načini delovanja (eng. *mode of action*) herbicida: 1) oponašanje auksina; 2) inhibicija transporta auksina; 3) inhibicija fotosinteze preko fotosistema PSII; 4) inhibicija acetolaktat-sintaze; 5) inhibicija acetyl-CoA-karboksilaze; 6) inhibicija sinteze celuloze; 7) inhibicija aktivnosti enzima 1-dezoksi-D-ksiluloze-5-fosfat-sintaze; 8) inhibicija aktivnosti dihidroorotat-dehidrogenaze; 9) inhibicija aktivnosti enzima dihidropteroat-sintaze; 10) inhibicija aktivnosti 3-fosfošikimat-1-karboksiviniltransferaze; 11) inhibicija tioesteraze masnih kiselina; 12) inhibicija glutamat-amonijum-ligaze; 13) inhibicija homogentizat-solanezil-transferaze; 14) inhibicija 4-hidroksifenilpiruvat-dioksigenaze; 15) inhibicija združivanja mikrotubula; 16) inhibicija organizacije mikrotubula; 17) inhibicija fitoen-desaturaze; 18) inhibicija protoporfirinogen-oksidaze; 19) inhibicija fosfoproteinske fosfataze; 20) inhibicija solanezil-difosfat-sintaze; 21) inhibicija sinteze masnih kiselina veoma dugog lanca; 22) inhibicija kretanja elektrona u fotosistemu PSI; 23) dekuplujući agensi. Većina pomenutih načina delovanja može se svrstati u jednu od sledećih kategorija herbicida: 1) inhibitori fotosinteze; 2) inhibitori biosinteze pigmenata; 3) inhibitori biosinteze lipida; 4) inhibitori biosinteze aminokiselina; 5) inhibitori deobe ćelija i 6) inhibitori aktivnosti auksina (Konstantinović, 2011; Zimdahl i Basinger, 2024).

1.1.3. Ograničenja i posledice primene sintetičkih herbicida: potreba za održivim i ekološkim rešenjima

Nekontrolisana upotreba sintetičkih herbicida u poljoprivredi ima značajan negativan uticaj na životnu sredinu, kao i direktan ili posledičan uticaj na zdravlje životinja i ljudi. Prema Sakthivel i sar. (2023) nedostaci konvencionalnih herbicida su: negativan uticaj na zemljište, dugotrajno zadržavanje u životnoj sredini i nemogućnost efikasne biorazgradnje, zamena zastupljenih vrsta korova, toksičnost za neciljane organizme, negativan uticaj na zdravlje životinja i ljudi, zagađenje životne sredine uključujući terestrijalne i akvatične ekosisteme i narušavanje biodiverziteta. Dodatan problem u poljoprivrednoj praksi predstavlja nepoštovanje preporučenih doza i karence navedenih od strane proizvođača.

Usled neadekvatne zaštite poljoprivrednika prilikom primene sintetičkih herbicida, zabeležena je pojava ozbiljnih zdravstvenih problema. Tako npr. direktno izlaganje 2,4-D može da

dovede do teške iritacije očiju i kože, mučnine, slabosti, umora i neurotoksičnih efekata, uključujući upalu nervnih završetaka (Yazid i sar., 2024). Auksinski herbicid 2,4,5-T je toksičan ukoliko se proguta ili apsorbira kroz kožu, a može da izazove i iritaciju očiju (Gupta i sar., 2006). Neauksinski herbicidi, kao što je glifosat (N-(fosfonometil)glicin), mogu da imaju ozbiljne posledice po zdravlje usled neadekvatne primene (iritacije kože i očiju, a u nekim slučajevima mogu izazvati respiratorne i neurološke probleme) (Bradberry i sar., 2004).

Pored pomenutih efekata izazvanih direktnim izlaganjem sintetičkim herbicidima, stručnjaci upozoravaju na njihov globalni uticaj na stanovništvo usled konzumacije pijaće vode, kao i namirnica proizvedenih od tretiranih poljoprivrednih kultura. Tako npr. herbicid 2,4-D, koji ima slabu adsorpciju na čestice zemljišta, lako dospeva u vodenu sredinu, gde je veoma postojan (Yazid i sar., 2024). Maksimalna dozvoljena koncentracija 2,4-D u vodi za piće je 100 mg L^{-1} , dok je za 2,4,5-T 30 mg L^{-1} (Gupta i sar., 2006; Pourata i sar., 2009). U ocednim vodama u Srbiji pronađene su rezidue pesticida kao što su 2,4 bis-fenol, difenil-sulfid, diizobutil-ftalat, dibutil-ftalat, eikozan, benzensulfonamin i benzenbutil ftalat (Adamov i sar., 2020), zatim atrazin (6-hloro- N^2 -etil- N^4 -izopropil-1,3,5-triazin-2,4-diamin), terbutilazin (N^2 -terc-butyl-6-hloro- N^4 -etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin), linuron 3-(3,4-dihloro-fenil)-1-metoksi-1-metilurea, prometrin (2-metilamino-4-etiltio-6-izopropilamino-1,3,5-triazin) i metolahlor (2-hloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-(1-metoksipropil-2-il)acetamid) (Meseldžija i sar., 2014). Atrazin se smatra jednim od opasnijih zagađivača životne sredine, naročito površinskih i podzemnih voda, i mora, u kojima može da ostane prisutan i duže od godinu dana (Bažulić Štimac i sar., 2006). Dodatno, brojne studije ukazuju na moguću pojavu glifosata u ocednim vodama, kao i u izvorima vode za piće usled neadekvatne upotrebe preparata koji ga sadrže, kao i nepotpune degradacije do aminometilfosfonske kiseline (Kjeldsen i sar., 2002; Hagner i sar., 2013; Adamov i sar., 2020).

Efekti sintetičkih herbicida prisutnih u pijaćim vodama ili konzumnim namirnicama imaju dugoročne posledice po zdravlje ljudi, kao i negativan uticaj na životinje i druge ne ciljane organizme. Dugoročne posledice akumulacije 2,4-D su poremećaji u endokrinom (Guerrero-Estévez i López-López, 2016), reproduktivnom (Garabrant i Philbert, 2002; Pattanasupong i sar., 2004) i nervnom sistemu (Garabrant i Philbert, 2002), genetičke aberacije (Lajmanovich i sar., 2015), imunotoksičnost (Garabrant i Philbert, 2002) i pojačan rizik od pojave kancera (Garabrant i Philbert, 2002; Loomis i sar., 2015). Kod ljudi, štetno delovanje 2,4-D može da se ogleda u razvoju Parkinsonove bolesti (Tanner i sar., 2009) i autizma (Román, 2007). Atrazin izaziva oštećenja DNK, pojavu malignih tumora i hromozomskih aberacija (Bažulić Štimac i sar., 2006), dok dikvat i parakvat mogu indukovati mutacije kod prokariotskih i eukariotskih organizama i izazvati nespecifična genetička oštećenja kod gljive *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter (Benigni i sar., 1979).

Posledice upotrebe herbicida su i masovno izumiranje pčela i trovanje ugroženih vrsta ptica. Poznato je da su pčele veoma osetljive na sintetičke herbicide, koji neretko izazivaju visoku smrtnost (oko 71%) (Cullen i sar., 2019). Posebno opasni za pčele su herbicid 2,4-D na bazi dimetil-amino soli i kombinacije herbicida 2,4-D sa MCPA i MCPP i herbicidima kao što su flurekol-butyl (butyl 9-hidroksifluoren-9-karboksilat), joksini-oksanoat ((4-cijano-2,6-dijodfenil) oksanoat), dikamba (3,6-dihloro-2-metoksibenzojeva kiselina), mekoprop (2-(4-hloro-2-metilfenoksi)propionska kiselina), dihlorprop (2-(2,4-diklorfenoksi)propionska kiselina), dikvat, parakvat, difenzokvat (1,2-dimetil-3,5-fenoksipirazolidin metilsulfat), simazin (6-hloro-N,N'-dietil-1,3,5-triazin-2,4-diamin) i amitrol (3-amino-1,2,4-triazol) (Živadinović, 1999). Glifosat negativno utiče na asocijativno učenje kod pčela radilica, kognitivne i senzorne sposobnosti mladih pčela u košnici i kašnjenje u razvoju larvi (Farina

i sar., 2019). Herbicidi utiču na povećanu smrtnost ptica i smanjenje njihove plodnosti (Fry, 1995). Direktno izlaganje herbicidima kao što su parakvat, trifluralin (2,6-dinitro-N,N-dipropil-4-(trifluorometil)anilin) i prometon (2-metoksi-4,6-bis(izopropilamino)-1,3,5-triazin) izaziva povećan mortalitet ptica i smanjen procenat izleganja mladih iz jaja (Hoffman, 1990), što posebno ugrožava očuvanje diverziteta ugroženih vrsta ptica.

Pored svega navedenog, kontrola korova koja podrazumeva trajnu upotrebu sintetičkih herbicida sa istim načinima delovanja, dovodi do pojave rezistencije korova. Najnoviji podaci ukazuju na postojanje 548 jedinstvenih slučajeva rezistencije, definisanih kao specifične kombinacije biljne vrste i mehanizma delovanja herbicida, koje uključuju ukupno 275 rezistentne korovske vrste (www.weedscience.org, 06.07.2026). Korovi su razvili rezistenciju na 21 od ukupno 31 do sada poznatih načina delovanja, odnosno na 168 različitih herbicida (www.weedscience.org, 06.07.2026).

Sve gore navedene negativne posledice primene sintetičkih herbicida dovele su do neosporne potrebe za razvojem ekološki pogodnih mera za zaštitu useva. Širom sveta razvijaju se strategije za smanjenje upotrebe sintetičkih herbicida i pesticida uopšte. Jedna od takvih strategija je *Farm to Fork* strategija u okviru programa *European Green Deal* (european-union.europa.eu, 14.8.2025), koja ima za cilj smanjenje upotrebe pesticida za 50% do 2030. godine, kao i povećanje površina za organsku poljoprivrednu proizvodnju do 25% ukupnog poljoprivrednog zemljišta. S obzirom na sve veće zahteve u Evropskoj uniji da se smanji upotreba pesticida i podstakne organska poljoprivredna proizvodnja, kao i realnih potreba domaćeg stanovništva za zdravom i kvalitetnom hranom, konstruisanje novih ekološki prihvatljivih bioherbicida bi predstavljalo značajan korak ka postizanju tih ciljeva.

1.1.4. Bioherbicidi kao održiva alternativa sintetičkim sredstvima za suzbijanje korova

S obzirom na mnoge probleme koji su posledica nesavesne primene sintetičkih herbicida, ali i usled same toksičnosti navedenih hemikalija, ukazala se potreba za uvođenjem biološke kontrole korova. Kalifornijski entomolog i profesor Hari Skot Smit uveo je termin „biološka kontrola” 1919. godine (Smith, 1919). Ovaj termin se u početku odnosio na primenu prirodnih neprijatelja u borbi protiv štetnih insekata, da bi se kasnije proširio i na druge organizme uključujući korove (Stenberg i sar., 2021). Prema definiciji Američke agencije za zaštitu životne sredine, termin „biološka kontrola”, pored navedenog, obuhvata i primenu biohemikalija produkovanih u biljkama i mikroorganizmima (www.epa.gov, 24.8.2025).

Bioherbicidi tradicionalno obuhvataju žive organizme, tačnije mikroorganizme, ili njihove produkte, uključujući i metabolite koje ovi organizmi proizvode tokom njihovog rastanja i razvića (Hynes i Boyetchko, 2006). Prvi bioherbicid je sintetisan i registrovan 1981. godine u SAD, sa komercijalnim nazivom DeVine[®], a njegov glavni sastojak bile su hlamidospore gljive *Phytophthora palmivora* Butler, koja se koristila u borbi protiv korovske vrste *Morrenia odorata* (Hook. & Arn.) Lindl. u zasadima citrusa (Boyetchko i sar., 2002). Takođe se biljni patogen *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk ubraja među prve mikroorganizme sa bioherbicidnom primenom (Klaic i sar., 2015). Među prvim bioherbicidima je i kanadski preparat BioMal[®], koji je sadržao spore ove gljive i koristio se za suzbijanje sitnolisnog sleza (*Malva pusilla* Sm.) (Boyetchko i sar., 2002).

Međutim, ograničenost tržišta i tehničke poteškoće povezane sa masovnom proizvodnjom bile su dva glavna razloga koja su sprečavala komercijalizaciju bioherbicida (Boyetchko i sar., 2002; Li i sar., 2003; Ash, 2010). Na svetskom tržištu registrovan je mali broj bioherbicida, od kojih je većina bazirana na mikroorganizmima (Cheng i Cheng, 2015). Do 2016. godine bilo je registrovano samo 13 bioherbicida, među kojima je devet mikološkog porekla, tri bakteriološkog, a samo jedan biljnog porekla (Cordeau i sar., 2016).

Prema podacima Američke agencije za zaštitu životne sredine pelargonična kiselina ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$, *n*-nonanska kiselina) je prva aktivna materija biljnog porekla koja je korišćena za formulaciju prirodnog herbicida (www.epa.gov, 24.8.2025). Pelargonična kiselina je prvi put izolovana iz listova biljke *Pelargonium × roseum* Ehrh. i ona je prepoznata kao prirodno rešenje za borbu protiv korova, koje nije toksično za ljude (Ciriminna i sar., 2019). Registrovana je u SAD 1992. godine (www.epa.gov, 24.8.2025). Godine 1994. prijavljena je upotreba pelargonične kiseline kao sredstva za proređivanje cvetova kako bi se sprečila alternativna rodost jabuke (Williams, 1994). Danas, upotreba pelargonične kiseline ima široku herbicidnu primenu u zaštiti vinograda, krompira, drvenastih biljaka, ukrasnog žbunja i travnjaka (Álvarez i sar., 2021, 2025). U skorije vreme su unapređene formulacije prirodnih herbicida na bazi etarskih ulja, tako da je u SAD registrovano šest takvih preparata (Verdeguer i sar., 2020). U **Tabeli 1** prikazani su registrovani bioherbicidi na bazi aktivnih supstanci iz biljaka.

Tabela 1. Registrovani bioherbicidi na bazi aktivnih supstanci biljnog porekla, prema Verdeguer i sar. (2020), Islam i sar. (2024), Shaffer (2025) i Shiffler (2025). NP – nema podataka.

Naziv proizvoda	Zemlja registracije	Godina registracije	Aktivna supstanca	Ciljani korovi
Summerset All Down Herbicide	USA	2010	sirćetna kiselina + limunska kiselina + beli luk	razni korovi
AvengerWeed Killer	USA	2005	70% <i>d</i> -limonen	razni korovi
AXXE®	USA	2014	amonijum-nonanoat	širokolisni i uskolisni korovi, mahovine i lišaji
Barrier H	Evropa, Japan, USA	2015	22,9% ulje limunove trave (<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle)	<i>Jacobaea vulgaris</i> (Gaertn.)
BioWeed	USA	2021	mrka alga <i>Ascophyllum nodosum</i> (L.) Le Jolis	razni korovi
Bioweed™	Novi Zeland	2001	10% ulje bora + šećer	širokolisni i uskolisni korovi
Blackberry & Brush Block	USA	2011	limunska kiselina	kupina, drvenaste i žbunaste vrste

Burnout®	USA	2016	limunska kiselina + ulje karanfilića	razni korovi
C-Cide	USA	NP	5% limunska kiselina	razni korovi
EcoSharp™	USA	2006	sirćetna kiselina	razni korovi
EcoSmart®	USA	2009	eugenol + 2-fenetil-propionat + natrijum-lauret-sulfat	razni korovi
GreenMatch	USA	2014	55% <i>d</i> -limonen	razni korovi
GreenMatch EX	USA	2008	50% ulje limunove trave	razni korovi
Katana®	USA	2016	pelargonična kiselina	širokolisni i uskolisni korovi
Matran® EC	USA	2010	ulje karanfilića	širokolisni korovi
Matratec	USA	2020	50% ulje karanfilića (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merrill & Perry)	razni korovi
NaturCur	USA	2009	ekstrakt crnog oraha (<i>Juglans nigra</i> L.)	<i>Cichorium intybus</i> L., <i>Portulaca oleracea</i> L., <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth
Scythe®	USA	1997	pelargonična kiselina + masne kiseline	razni korovi
Vinagreen	USA	2019	sirćetna kiselina	razni korovi
Weed Pharm	USA	NP	sirćetna kiselina	razni korovi
Weed Slayer	Malezija	2017	6% eugenol	razni korovi
WeedLock	Malezija	2017	ekstrakt <i>Solanum habrochaites</i> S.Knapp & D.M.Spooner	razni korovi

WeedZap	USA	NP	45% ulje karanfilića + 45% ulje cimeta	mali širokolisni i uskolisni korovi
---------	-----	----	---	--

U industriji herbicida postoje i sintetički derivati prirodnih supstanci, koji se dobijaju njihovom hemijskom obradom. Takav je, na primer, komercijalni herbicid cinmetilin, koji je analog prirodnom fitotoksičnom jedinjenju 1,4-cineolu, a otkriven je i razvijen od strane američke kompanije *Shell Chemicals* (Grayson i sar., 1987). Mehanizam delovanja cinmetilina je zasnovan na inhibiciji acil-ACP tioesteraze i biosinteze masnih kiselina u biljnim tkivima (Campe i sar., 2018).

Triketonski herbicidi su derivati prirodnog jedinjenja leptospermona, koji se sintetiše u biljkama iz familije Myrtaceae, kao što su *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels i *Leptospermum scoparium* J. R. Forst. & G. Forst (Knudsen i sar., 2000). Triketonski herbicidi inhibiraju 4-hidroksifenilpiruvat-dioksigenazu, enzim koji igra ključnu ulogu u biosintezi karotenoida i α -tokoferola (vitamina E), što dovodi do destabilizacije fotosintetskog aparata i hloroze (Dayan i sar., 2007).

1.1.5. Halkoni kao molekulska osnova za razvoj bioherbicida

Fitotoksični potencijal halkona je privukao pažnju naučnika pre dve decenije, počevši od istraživanja *trans*-halkona (1,3-difenil-2-propen-1-ona). Chen i sar. (2004, 2005) su pokazali da *trans*-halkon intenzivno inhibira rastenje izdanaka i korena kod 20 zeljastih vrsta biljaka. Ubrzo nakon toga, Yun i sar. (2009) su sugerisali da je jedan od ključnih enzima u biosintezi monomera lignina, 4-kumarat-koenzim A ligaza, potencijalna meta halkona u procesu inhibicije rastenja. Rezultati Chen i sar. (2011) su ukazali da je inhibicija rastenja ćelijskih kultura soje (*Glycine max* (L.) Merr.) indukovana *trans*-halkonom, i da je povezana sa inhibicijom biosinteze lignina. Jedinjenje *trans*-halkon je negativno uticao i na rastenje korena klijanaca *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Primena *trans*-halkona u koncentraciji od 12,5 mM je redukovala izduživanje korena klijanaca i do 30% u poređenju sa kontrolom, dok je 1200 mM *trans*-halkon inhibirao čak 94% izduživanje korena (Díaz-Tielas i sar., 2012).

Tretman kijanaca *A. thaliana* sa 25 mM *trans*-halkonom doveo je do značajnog smanjenja gustine korenovih dlačica. Takođe, primenjeni tretman je inhibirao proces akumulacije skroba u amiloplastima, što se odrazilo i na gravitropski odgovor klijanaca. Apikalne meristemske ćelije korena *A. thaliana* tretirane sa halkonom u srednjoj inhibitornoj koncentraciji ($IC_{50} = 35$ mM), posedovale su karakteristične markere programirane ćelijske smrti, uključujući mitohondrijalnu kondenzaciju, dezintegraciju organela i fragmentaciju hromatina (Díaz-Tielas i sar., 2012). Primećen je uticaj *trans*-halkona i na razviće i fiziologiju odraslih biljaka *A. thaliana*, a njegovi efekti su varirali u zavisnosti od toga da li je primenjen putem zalivanja ili prskanja (Díaz-Tielas i sar., 2014).

Efekti *trans*-halkona izučavani su i na drugim biljnim vrstama. Tako je zabeležen efekat ovog halkonskog jedinjenja na inhibiciju klijanja semena kod uskolisne bokvice (*Plantago lanceolata* L.) i salate (*Lactuca sativa* L.), kao i rano rastenje korena kod korovskih vrsta: štira (*Amaranthus retroflexus* L.), velikog muhara (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) i *P. lanceolata* (Díaz-Tielas i sar., 2014). Tretman *trans*-halkonom je takođe negativno uticao na nadzemne delove biljaka. Na

primer, *A. thaliana*, *A. retroflexus* i pšenica (*Triticum aestivum* L.) su pokazale izraženu hlorozu listova tokom tretmana *trans*-halkonom (Díaz-Tielas i sar., 2012, 2014). Progresivna hloroza izdanaka *A. thaliana* je povezana sa značajnim poremećajima u strukturi i funkciji hloroplasta. Ove promene su praćene značajnom akumulacijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS), degradacijom pigmenata, poremećajem procesa fotosinteze i pojavom programirane ćelijske smrti (Díaz-Tielas i sar., 2017). Analiza transkriptoma je ukazala da su mnogi od ključnih gena transkripcioni faktori, kao i geni povezani sa oksidativnim stresom, detoksikacijom ksenobiotika, biosintezom abscisinske kiseline (eng. *abscisic acid*, ABA) i auksina, kao i geni uključeni u primarne metaboličke procese. Rezultati ukazuju na to da ovi metabolički i regulatorni mehanizmi imaju značajnu ulogu u odgovoru biljke na tretman *trans*-halkonom (Díaz-Tielas i sar., 2019). KEGG (eng. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) analizom je pokazano da su efekti *trans*-halkona spregnuti sa mehanizmima odbrane od stresa uključujući specijalizovani metabolizam, metabolizam glutaciona i prenos hormonskih signala, kao i sa metabolizmom aminokiselina, sumpora i fenilpropanoida. Geni uključeni u funkcionisanje proteazoma, obradu proteina i funkciju peroksizoma su takođe bili diferencijalno eksprimirani usled tretmana *trans*-halkonom (Díaz-Tielas i sar., 2019).

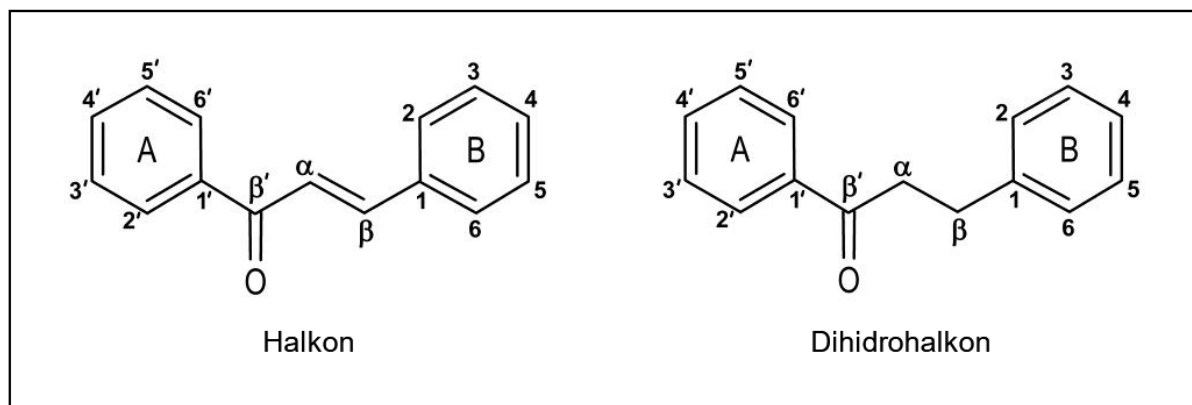
Značajnu fitotoksičnost pokazali su sintetički derivati halkona, pri čemu je njihova efikasnost zavisila od vrste i položaja supstituenata na A i B prstenovima, kao i od primenjene koncentracije i osetljivosti ciljne biljne vrste ili tkiva. Chotsaeng i sar. (2019) su sintetisali 45 različitih halkonskih derivata, među kojima je bio halkon 14f, koji se karakteriše tiofenil grupom na prstenu A i grupom fenoksisirćetne kiseline na prstenu B. Ovaj halkon se pokazao superiornim u pogledu inhibicije klijanja semena i rastenja klijanaca trobojnog štira (*Amaranthus tricolor* L.) i *E. crus-galli*. Pri najvišoj primenjenoj koncentraciji od 1600 mM, halkon 14f je u potpunosti inhibirao klijanje semena *A. tricolor* i značajno smanjio klijavost semena (42%), dužinu izdanka (51%) i dužinu korena (79%) kod *E. crus-galli*.

Perera i sar. (2019) su naveli nekoliko derivata prirodnih halkona izolovanih iz ekstrakta pustinjačke vrste *Ambrosia salsola* (Torr. & A. Gray) Strother & B. G. Baldwin, koji ispoljavaju umereni fitotoksični efekat. Tako su se salsolol A i B pokazali fitotoksičnim za sočivicu (*Lemna paucicostata* Hegelm. ex Engelm.), dok salsolol C i balanohalkon nisu imali nikakvu fitotoksičnu aktivnost.

Pokazano je da su derivati halkona, 2',3',4',3,4-pentahidroksihalkon i 2',3',4'-trihidroksihalkon, moćni inhibitori fosfoenolpiruvat-karboksilaze, kritičnog enzima za fiksaciju ugljenika i produkciju biomase u C4 fotosintetskom putu kod mnogih problematičnih vrsta korova iz rodova *Amaranthus* L., *Setaria* P. Beauv., *Digitaria* Haller, *Echinochloa* P. Beauv., kao i kod vrsta divljeg sarka (*Sorghum halepense* (L.) Pers.), *Paspalum dilatatum* Poir. i *Abutilon theophrasti* Medik. (Nguyen i sar., 2016). Oba pomenuta halkonska derivata su značajno inhibirala rastenje korova, bez uticaja na uljanu repicu (*Brassica napus* L.), koja pripada C3 tipu biljaka (Nguyen i sar., 2016).

1.2. FLORETIN

Floretin (3-(4-hidroksifenil)-1-(2,4,6-trihidroksifenil)propan-1-on) je fenolno jedinjenje halkonske strukture koje pripada grupi dihidrohalkona. Halkoni i dihidrohalkoni su sekundarni metaboliti biljaka koje karakteriše struktura otvorenog lanca sa dva aromatična prstena (A i B) povezana α,β -nezasićenim karbonilnim mostom od tri atoma ugljenika (**Slika 1**). Ovaj jedinstveni strukturni okvir daje halkonima visok stepen hemijske reaktivnosti i multifunkcionalnosti, čime ih svrstava među ključne intermedijere u biosintezi različitih flavonoida i izoflavonoida u biljkama (Dziągwa-Becker i sar., 2024b). Do sada je identifikovano preko 250 aglikona i O-glikozida halkona u fitohemijskom profilu vrsta iz 54 porodice biljaka, od čega pretežno kod dikotiledonih, ali i kod nekih monokotiledonih vrsta, paprati i golosemenica (Iwashina, 2000). Glikozidi halkona se obično nalaze u sastavu žutih cvetnih pigmenta kod rodova georgina (*Dahlia* Cav.), *Coreopsis* L., i *Cosmos* Cav. (Giannasi, 1972; Crawford i Stuessy, 1981), i kod vrsta kao što su *Paeonia trollioides* Stapf ex Stern, baštenski karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.), *Aeschynanthus parvifolius* R. Br. i *Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson (Harborne, 1966). Biljke koje sadrže halkone, kao što su sladić (*Glycyrrhiza glabra* L.), kava-kava (*Piper methysticum* G. Forst.), kineski đumbir (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) i *Lophira alata* Banks ex C. F. Gaertn., dugi niz godina se koriste kao tradicionalni lekovi za različite medicinske indikacije (Fenwick i sar., 1990; Isa i sar., 2012; Abu i sar., 2013; Ajiboye i sar., 2014).



Slika 1. Strukturne formule halkona i dihidrohalkona.

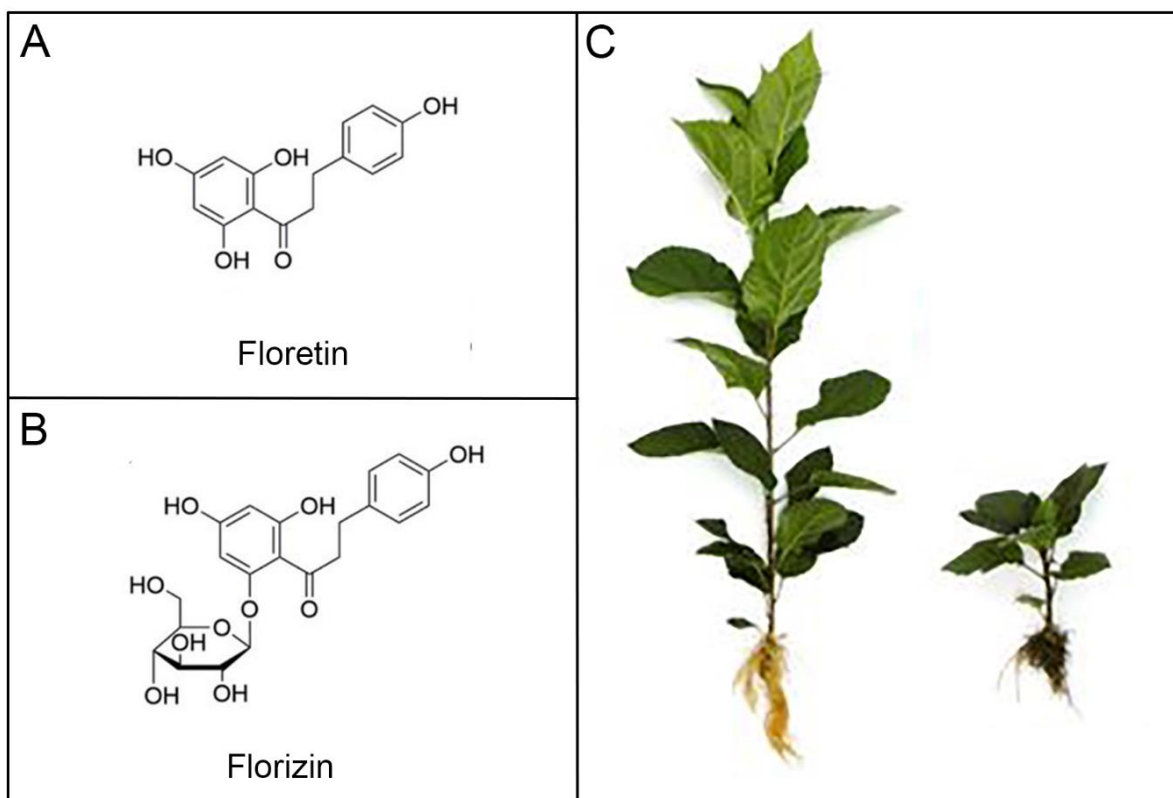
Dihidrohalkoni predstavljaju izdvojenu grupu halkonskih jedinjenja koju karakteriše odsustvo dvostruke veze između ugljenikovih atoma na α - i β -poziciji u okviru karbonilnog mosta (**Slika 1**). Specifičan prirodan izvor dihidrohalkona predstavljaju biljne vrste iz roda *Malus* Mill., uključujući domaću jabuku (*Malus × domestica* (Suckow) Borkh.) i divlje vrste kao što su *M. pumila* Mill., *M. sylvestris* (L.) Mill., *M. doumeri* (Bois) A. Chev., *M. sieversii* (Ledeb.) M. Roem., *M. sieboldii* Rehder, *M. toringoides* (Rehder) Hughes i *M. trilobata* (Labill. ex Poir.) C. K. Schneid. (Hunter i Hull, 1993; Gökmen i sar., 2003; Leu i sar., 2006; Wang i sar., 2020, 2023). U listovima domaće jabuke, dihidrohalkoni čine čak 96-97% ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja (Pontais i sar., 2008; Dugé de Bernoville i sar., 2011).

Floretin (**Slika 2A**) predstavlja osnovni dihidrohalkon (aglikon) iz kojeg se procesom glikozilacije formiraju različiti glikozilovani derivati koji se međusobno razlikuju prema vrsti i mestima vezivanja ugljenohidratnih supstituenata. Najčešće detektovani derivati floretina kod vrsta roda *Malus* su: florizin (floretin 2'-O- β -D-glukozid), sieboldin (floretin 4',2'-di-O-glukozid), trilobatin (floretin-4'-O- β -D-glukozid) i floretin-2'-O-ksilozil glukozid.

Florizin (**Slika 2B**) je prvi identifikovan i ujedno najzastupljeniji dihidrohalkon koji čini čak 4-18% suve mase listova domaće jabuke (Mikulic Petkovšek i sar., 2009). Značajne količine florizina se takođe nalaze u korenu, stablu i kori drveta jabuke, dok je u manjoj meri zastupljen i u plodovima (De Koninck, 1835). Ključni korak u biosintezi florizina je glikozilacija floretina na 2' poziciji koju katalizuje floretin uridin-difosfat-glikoziltransferaza (Zhou i sar., 2017). Zbog svoje široke rasprostranjenosti, florizin služi kao ključni parametar za klasifikaciju vrsta iz roda *Malus*, kao i određivanja filogenetskih i fitogeografskih odnosa u okviru podfamilije Maloideae (Aldasoro i sar., 2005). Takođe, florizin se koristi i kao pouzdani marker u prehrambenoj industriji za detektovanje prisustva ekstrakta ploda jabuke u mešavini voćnih sokova (Fernández de Simón i sar., 1992).

Florizin je prisutan u tragovima kod drugih vrsta iz familije Rosaceae, kao što su jagoda (*Fragaria* $\times$ *ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier) (Hilt i sar., 2003) i ruža (*Rosa canina* L.) (Hvattum, 2002). Prisustvo floretina u tragovima je detektovano i u vrstama iz familije Ericaceae, kao što su brusnica (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) (Turner i sar., 2005), japanska andromeda (*Pieris japonica* (Thunb.) D. Don ex G. Don) (Yao i sar., 2005), planinski lovor (*Kalmia latifolia* L.) (Mancini i Edwards, 1979) i puzava azaleja (*K. procumbens* (L.) Gift, Kron & P. F. Stevens ex Galasso, Banfi & F. Conti) (Cuendet i sar., 2000), kao i u vrstama iz drugih familija: nar (*Punica granatum* L.) (Lythraceae) (Mena i sar., 2012), *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) (Funari i sar., 2011), *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. (Zingiberaceae) (Cheenpracha i sar., 2006), balsamatska topola (*Populus balsamifera* L.) (Salicaceae) (Greenaway i sar., 1989), *Lithocarpus polystachyus* Rehder (Fagaceae) (Dong i sar., 2007) i leska (*Corylus avellana* L.) (Betulaceae) (Ciarmiello i sar., 2014).

Uprkos izuzetno visokoj zastupljenosti dihidrohalkona u vrstama roda *Malus*, njihova fiziološka uloga još uvek nije dovoljno istražena. Neke od potencijalnih fizioloških funkcija dihidrohalkona u biljkama su odbrana od stresa usled njihovih izraženih antioksidativnih karakteristika (Dugé de Bernoville i sar., 2011; Ibdah i sar., 2017), uloga UV „filtera” u listovima (Dugé de Bernoville i sar., 2011), antivirusna uloga (Ben-Othman i sar., 2021), kao i učešće u zaštiti od bolesti izazvanih insektima ili patogenim gljivama, kao što je npr. čađava krastavost jabuke koju indukuje gljiva *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter (Slatnar i sar., 2010; Neyman i sar., 2024). O fiziološkoj ulozi floretina i njegovom učešću u metaboličkim procesima ima tek nekoliko novijih radova. Wang i saradnici (2024) su proučavali fiziološku ulogu glikozida floretina (florizina, trilobatina i floretin-3',5'-di-C-glikozida) u domaćoj jabuci. Oni su utvrdili da su transgene linije jabuke koje su imale manju količinu florizina ispoljavale patuljasto rastenje, poremećaj u regulaciji otvorenosti stoma i manju toleranciju na sušu, kao i povećanu osetljivost na infekciju paučinastim grinjama (*Tetranychus urticae* Koch). Pored toga, Li i sar. (2024) navode da se floretin pojačano akumulirao u listovima *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehder na većim nadmorskim visinama uz smanjenje intenziteta procesa fotosinteze, što bi moglo da predstavlja potencijalnu ulogu u zaštiti od UV zračenja.



Slika 2. Strukturne formule floretina (**A**) i florizina (**B**); Autotoksičnost u zasadu jabuke (**C**): zdrave sadnice jabuke nakon osam nedelja (levo) i sadnice jabuke zahvaćene ARDom (desno). Slike sadnica su preuzete iz publikacije Mahnkopp i sar. (2018). ARD – „Apple Replant Disease”.

Analize transkriptoma i sadržaja fitohormona kod domaće jabuke su pokazale da floretin može da moduliše signalne puteve auksina i abscisinske kiseline, kao i ekspresiju karbonatne dehidrataze i na taj način negativno reguliše veličinu, prostorni raspored i stepen otvorenosti stoma, sprečavajući odavanje vode i doprinoseći otpornosti na sušu (Wang i sar., 2024). Jedan od ključnih zaključaka istraživanja Wang i saradnika (2024) se odnosi na metabolizam i funkcionalnu razliku među glikozidnim oblicima floretina. Oni su pokazali da se florizin može hidrolizovati u floretin unutar biljke, omogućavajući njegovo aktivno delovanje, dok trilobatin i floretin-3',5'-di-C-glikozid

nemaju ovu sposobnost. Ovi rezultati ukazuju na to da glikozilacija floretina u florizin u jabuci nije samo metabolički proces, već i mehanizam regulacije fizioloških funkcija i otpornosti biljke na različite oblike stresa.

Zbog svoje tipične dihidrohalkonske strukture i odsustva ugljenohidratnih komponenti, floretin je veoma fleksibilan molekul koji je sposoban da efikasno interaguje sa drugim biološkim makromolekulima, što mu daje širok spektar bioloških aktivnosti (Behzad i sar., 2017; Choi, 2019; Tuli i sar., 2022; Habtemariam, 2023; Shelke i sar., 2024). Shodno tome, floretin je temeljno istraživao kroz farmakološka i klinička ispitivanja, gde je prepoznat kao jedinjenje sa izuzetnim antioksidativnim, antikancerogenim i imunoprotektivnim svojstvima (Barreca i sar., 2014; Nithiya i Udayakumar, 2016; Behzad i sar., 2017; Mariadoss i sar., 2019). Brojni autori izveštavaju o potencijalnoj primeni floretina u različitim terapijskim pristupima, uključujući lečenje osteoartritisa (Zheng i sar., 2018) i dermatoloških promena (Casarini i sar., 2020), njegovu upotrebu kao antiinflamatornog i citoprotektivnog agensa (Chang i sar., 2012; de Oliveira, 2016), kao i pomoćnog sredstva u terapiji dijabetesa i maligniteta (Sampath i sar., 2017; Choi, 2019).

1.2.1. Fitotoksični potencijal floretina: pregled postojećih studija

Prva zapažanja o potencijalnoj fitotoksičnosti floretina i njegovog glikozida florizina se odnose na pojavu autotoksičnosti u zasadima jabuke (Börner 1959, 1960). Uzgajivači jabuke su primetili neobične simptome kod novih sadnica nakon sadnje na mestima nekadašnjih voćnjaka jabuke. Sadnice su se teško primale u takva zemljišta, imale su slabo razvijen korenov sistem, usporeno rastenje, niske prinose i loš kvalitet plodova, zbog čega je ova pojava nazvana „*Apple Replant Disease*” (ARD) (Börner 1959, 1960) (**Slika 2C**). Istraživanja Zhang i sar. (2007) i Bai i sar. (2009) su ukazala da eksudati korena vrsta *M. pumila* i *M. prunifolia* (Willd.) Borkh. deluju inhibitorno na klijanje i rastenje klijanaca sopstvene vrste. Uprkos veoma polemisanj etilogiji ARD-a (Weiß i sar. 2017; Mahnkopp i sar. 2018), floretin i florizin, koji se izlučuju iz korena jabuke ili nastaju razlaganjem kore stabla, listova, plodova, korena ili drugih delova drveta, mogu se smatrati ključnim faktorima uključenim u manifestaciju ARD-a (Yin i sar., 2016; Nicola i sar., 2017; Yin i sar., 2018). Nicola i saradnici (2017) su ukazali da smeša zemlje i usitnjenih korenova od podloge za kalemljenje jabuke – M26, negativno utiče na klijanje jabuke sorte Fudži, smanjujući sadržaj hlorofila, masu korena i ukupnu masu klijanaca. Hemijskom analizom zemljišta je detektovan povećan sadržaj florizina i floretina u pomenutoj smeši. Detaljna istraživanja su pokazala da egzogena primena florizina u visokim koncentracijama (1 – 4 mM) dovodi do pojave autotoksičnosti kod vrste *M. hupehensis*. Kod klijanaca je zabeleženo značajno smanjenje intenziteta fotosinteze i ćelijske respiracije, kao i povećanje sadržaja malondialdehida (MDA) i aktivnosti antioksidativnih enzima (Jianghong i sar., 2007). Slične efekte su uočili Cui i sar. (2010) kod vrste *Malus × micromalus* Makino, gde je florizin doveo do porasta aktivnosti antioksidativnih enzima i sadržaja MDA i prolina, srazmerno koncentraciji i trajanju tretmana. Wang i saradnici (2012) su ustanovili smanjenje intenziteta ćelijske respiracije i aktivnosti enzima uključenih u ciklus trikarboksilne kiseline u korenu vrste *M. hupehensis* koji je tretiran 4 mM florizinom. Pored toga, tretman floretinom i florizinom u koncentracijama detektovanim u zemljištu voćnjaka je izazvao povećanje nivoa ekspresije gena koji kodiraju proteine uključene u zaštitne mehanizme korena vrste *M. hupehensis* (Yin i sar., 2018). Nedavno su Xiang i sar. (2021) analizirali korelaciju između prisustva florizina, organske materije i gljiva iz rodova *Fusarium* Link i *Mortierella* Coem. u

zemljištu sa stepenom manifestacije simptoma ARD kod sadnica jabuke. Matematičko modeliranje je potvrdilo da na stepen razvijenosti simptoma bolesti utiče prisustvo sva tri činioca: mikroorganizmi, florizin i organska materija u zemljištu. Svi ovi nalazi ukazuju na to da bi dihidrohalkoni, bilo da se izlučuju iz korena ili oslobađaju tokom razgradnje organske materije, mogli da igraju ulogu u razvoju simptoma ARD, bilo direktno ili indirektno utičući na mikroorganizme rizosfere.

Istraživanja naše istraživačke grupe su pokazala da eksudati korena domaće jabuke sorte Zlatni delišes imaju inhibitorno delovanje na rastenje i razviće klijanaca *A. thaliana* (Stanišić i sar., 2019), što predstavlja pionirski korak u istraživanjima fitotoksičnosti dihidrohalkona jabuke prema vrstama izvan roda *Malus*. Analizom hemijskog sastava eksudata korena jabuke, pored kafeinske i hlorogene kiseline, detektovani su floretin i florizin u približno jednakim koncentracijama od ~3,5 ng mg⁻¹ suve mase korenova. Tretman eksudatom korena jabuke je doveo do smanjenja izduživanja korena klijanaca *A. thaliana* za 35% i izdanaka za 62% (Stanišić i sar., 2019). Ipak, najizraženiji uticaj je ostvaren na formiranje bočnih korenova, pri čemu je njihov broj smanjen za čak 74% nakon 10 dana tretmana. Autori su pokazali da je inhibicija izduživanja korena kod klijanaca povezana sa narušenom ekspresijom gena za ciklin-zavisne kinaze (CDK) (Stanišić i sar., 2019) koje igraju ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i evolutivno konzerviranom mehanizmu deobe ćelija kod eukariota (Berckmans i De Veylder, 2009). Tretman klijanaca *A. thaliana* eksudatom korena jabuke u trajanju od 10 dana je doveo do smanjenja nivoa ekspresije gena za ciklin-zavisne kinaze *CDKA1;1* i *CDKB2;1* i cikline *CYCA3;1* i *CYCB2;4* u izdancima, dok je njihova ekspresija u korenu ostala nepromenjena (Stanišić i sar., 2019).

1.3. AUKSINI: BIOSINTEZA, TRANSPORT I FIZIOLOŠKE FUNKCIJE U RASTENJU I RAZVIĆU BILJAKA

Fitohormon auksin, odnosno indol-3-sirćetna kiselina (IAA), kao njegov najzastupljeniji oblik u biljkama je dobio naziv po grčkoj reči „αυξάνω” što znači rasti, jer je prvobitno bio poznat kao „hormon rasta”. Otkrio ga je holandski botaničar Frits Varmolt Vent 1928. godine, kada je izdvojio ovaj fitohormon iz vršnog dela koleoptila ovsu i opisao njegovu ulogu u regulisanju rastenja biljaka. Ubrzo nakon toga, američki naučnik Kenet Triman je izolovao IAA kao čistu supstancu i identifikovao njenu hemijsku strukturu.

Auksini predstavljaju jednu od najvažnijih grupa fitohormona koja je uključena u većinu razvojnih i fizioloških procesa tokom čitavog životnog ciklusa (Mockaitis i Estelle, 2008; Cui i sar., 2013; Ljung, 2013; Mishra i sar., 2022; Yu i sar., 2022). Smatra se da su auksini ključni za biljku počevši od prvih zigotskih deoba (Mockaitis i Estelle, 2008; Mishra i sar., 2022). Tokom embriogeneze, auksini su neophodni za diferencijaciju inicijalnih ćelija meristema korena i vaskularnu povezanost svih organa u razvoju. Kako biljka sazreva, auksini reaktiviraju diferencirane ćelije tako da promovišu dodatni razvoj vaskularnog tkiva i regulišu formiranje bočnih organa (Mockaitis i Estelle, 2008). Na taj način akumulacija auksina u ćelijama pericikla određuje mesto inicijacije bočnog korena, a u grupama ćelija na periferiji apikalnog meristema izdanaka određuje

mesto inicijacije lisne ili cvetne primordije (Benková i sar., 2009). Tokom celog životnog ciklusa, auksini utiču na deobu i izduživanje ćelija i omogućavaju rastenje biljaka. Auksini takođe regulišu tropizme, arhitekturu podzemnih i nadzemnih organa (Quint i Gray, 2006; Cui i sar., 2013; Ljung, 2013; Yu i sar., 2022), kao i razvoj i formiranje cvetnih organa (Krizek, 2011).

1.3.1. Biosinteza auksina

Auksini se sintetišu u meristemskim tkivima korena i izdanka, mladim listovima, kotiledonima i nezrelim plodovima (Zažímalová i Napier, 2003). Putevi biosinteze auksina mogu da budu nezavisni i zavisni od triptofana. L-triptofan (TRP) je aromatična amino-kiselina koja se sintetiše u hloroplastima šikiminskim putem (Mano i Nemoto, 2012). Najpre se šikiminska kiselina konvertuje u horizminsku kiselinu, koja prelazi u antranilat. Zatim nastaje fosforibozilantranilat, koji nizom biohemijskih reakcija prelazi u indol-3-glicerol fosfat. Uz pomoć enzima triptofan-sintaze, triptofan se sintetiše iz indol-3-glicerol fosfata i serina.

Triptofan predstavlja ključni prekursor za četiri glavna načina biosinteze auksina (**Slika 3**) (Mano i Nemoto, 2012; Pěňčík i sar., 2018; Menon i sar., 2022):

- Put triptamina (TAM)
- Put indol-3-piruvata (IPyA)
- Put indol-3-acetamida (IAM)
- Put indol-3-acetaldoksima (IAOx)

1.3.1.1. Put triptamina

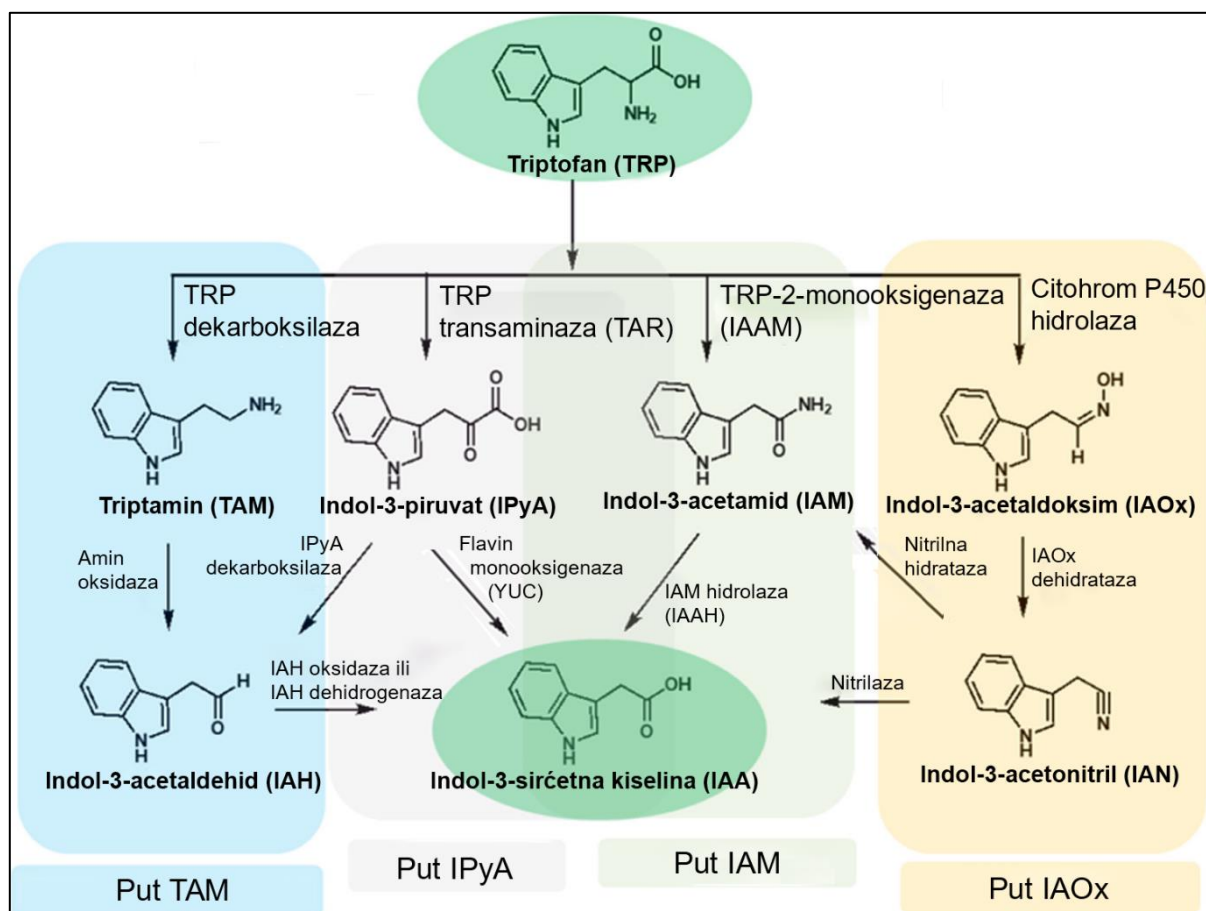
Triptamin (TAM) je organsko jedinjenje koje se sintetiše iz triptofana. Iako prisutan u tragovima, važan je kao prekursor za proizvodnju drugih biološki aktivnih supstanci. Put sinteze IAA preko TAM obuhvata početni korak dekarboksilacije TRP pri čemu nastaje TAM (**Slika 3**), a zatim korak deaminacije uz pomoć amin-oksidaze, pri čemu nastaje indol-3-acetaldehid (IAH), koji se zatim oksiduje do IAA (Zažímalová i Napier, 2003; Menon i sar., 2022).

1.3.1.2. Put indol-3-piruvata

Put indol-3-piruvata (IPyA) se smatra jednim od najzastupljenijih puteva biosinteze auksina u biljnom carstvu (Luo i Di, 2023). Najpre se TRP, uz pomoć triptofan-aminotransferaze (TAR), konvertuje u IPyA (**Slika 3**). Nakon toga, IPyA se može direktno konvertovati u IAA posredstvom flavin-monooksigenaze (YUC) ili dekarboksilisati do IAH, nakon čega nastaje IAA (Menon i sar., 2022). Ranije se smatralo da je ovaj biosintetski put najdominantniji u *A. thaliana*, ali su genetska istraživanja to opovrgnula (Mano i Nemoto, 2012).

1.3.1.3. Put indol-3-acetamida

Biosintetski put indol-3-acetamida (IAM) podrazumeva konverziju TRP u IAM uz pomoć enzima triptofan-2-monooksigenaze (IAAM) koju kodira gen *aux1/iaaM/tms1*, a zatim se IAM konvertuje u IAA uz pomoć IAM-hidrolaze (IAAH) koju kodira gen *aux2/iaaH/tms2* (Woodward i Bartel, 2005; Mano i Nemoto, 2012). Put IAM se smatra zasebnim putem, iako on može da bude i deo puta IAOx (Slika 3) (Kasahara, 2016).



Slika 3. Šematski prikaz biosintetskih puteva auksina koji su zavisni od triptofana. Preuzeto i modifikovano iz Menon i sar. (2022).

1.3.1.4. Put indol-3-acetaldoksima

Put indol-3-acetaldoksima (IAOx) je najčešći i najvažniji način biosinteze auksina kod *A. thaliana* (Slika 3). Ovaj put je karakterističan za rod *Brassica* L. (Sugawara i sar., 2009), gde se uz pomoć dva enzima za sintezu citohroma P450 pod nazivom CYP79B2 i CYP79B3 (citohrom P450 monooksigenaze), triptofan direktno pretvara u IAOx (Zažimalová i Napier, 2003) koji dalje može da se konvertuje u indol-3-acetonitril (IAN) i indol-3-acetamid (IAM), direktne prekursore u biosintezi IAA (Zhao i sar., 2002; Sugawara i sar., 2009; Brumos i sar., 2014). U ovom biosintetskom putu, IAN, koji nastaje od IAOx, može da pređe direktno u IAA pod dejstvom nitrilaze. Alternativno, IAN prelazi u IAM posredstvom nitrilne hidrataze, a zatim u IAA (Slika 3).

Mano i Nemoto (2012) naglašavaju da biosintetski put IAOx nije uobičajen za biljne vrste i da su geni *CYP79B* pronađeni samo kod vrsta *A. thaliana*, uljane repice (*Brassica napus* L.) i bele slačice (*Sinapis alba* L.). IAOx je prvobitno izolovan iz kupusa (*Brassica oleracea* L.) i repe (*B. campestris* L.) (Mano i Nemoto, 2012). Kod *A. thaliana*, IAOx je takođe prekursor za biosintezu glukobrasicina i kamaleksina (Kasahara, 2016). Ekspresija gena *CYP79B2* je najizraženija u mladom korenu, kotiledonima i vaskularnim tkivima kod *A. thaliana* (Kasahara, 2016).

1.3.1.5. Biosintetski putevi auksina nezavisni od triptofana

U slučaju biosinteze IAA nezavisno od TRP, IAA nastaje od antralinata, ali ne preko TRP, nego od indol-3-glicerol-fosfata i indola. Oba načina biosinteze IAA mogu da budu zastupljena u istoj biljci. Put nezavisan od TRP je karakterističan za posebne stadijume u embriogenezi i u rastenju klijanaca (Zažímalová i Napier, 2003). Neka istraživanja sugerišu da bi ovaj način biosinteze IAA mogao da ima značajnu ulogu kod *A. thaliana* (Kasahara, 2016).

1.3.2. Metabolizam auksina

Zbog delikatnosti u regulaciji fizioloških procesa koji zavise od koncentracije auksina, biljke su razvile nekoliko mehanizama za kontrolu sadržaja aktivnog auksina. Jedan od njih je formiranje neaktivnih konjugata sa amino-kiselinama, šećerima ili peptidima koji imaju ulogu u skladištenju IAA ili ulogu intermedijera u nepovratnom procesu razgradnje čiji je krajnji produkt oksindol-3-sirćetna kiselina (oxIAA) (Hayashi i sar., 2021). Još jedan način za skladištenje IAA je njegova konverzija u indol-buternu kiselinu (eng. *indole-3-butyric acid*, IBA). Ovaj proces je reverzibilan, tako da iz IBA može nastati slobodna IAA putem β -oksidacije (Woodward i Bartel, 2005).

Kod *A. thaliana* su otkrivena četiri ključna enzima odgovorna za inaktivaciju slobodne (aktivne) IAA (Hayashi i sar., 2021):

- IAA karboksil-metiltransferaza 1, koja konvertuje IAA u IAA-metil-estar;
- UDP glukoziltransferaza UGT84B1, koja katalzuje formiranje IAA- β -D-glukozida *in vivo* i *in vitro*;
- Dioksidgenaza za oksidaciju auksina (DAO1), koja konvertuje IAA do oxIAA;
- Acil-amido-sintetaza, indukovana genom *GRETSCENHAGEN3* (*GH3*), koja katalizuje reakcije konjugacije IAA sa aminokiselinama, pri čemu nastaju IAA aspartat (IAA-Asp) i IAA glutamat (IAA-Glu).

Najnovija istraživanja su pokazala da konjugati IAA sa aminokiselinama aspartatom i glutamatom (IAA-Asp i IAA-Glu) mogu istovremeno da služe kao oblici za skladištenje IAA i kao intermedijeri u procesu degradacije IAA do oxIAA (Hayashi i sar., 2021).

Novi model održavanja metaboličke homeostaze auksina pretpostavlja da ne dolazi do direktne oksidacije IAA do oxIAA, već do ireverzibilne oksidacije IAA-Asp i IAA-Glu posredstvom enzima DAO1, pri čemu nastaju oxIAA-Asp i oxIAA-Glu koji hidrolizom oslobađaju oxIAA (Hayashi i sar., 2021). S druge strane, auksinski konjugati sa aminokiselinama IAA-Asp i IAA-Glu

mogu se reverzibilno konvertovati u slobodnu IAA uz pomoć enzima IAA-Leu-Resistant1 (ILR1) (Hayashi i sar., 2021) u slučajevima kada je to potrebno, kao što je klijanje semena (Woodward i Bartel, 2005) i izduživanje hipokotila (Zheng i sar., 2016). Za monokotile je karakteristično da skladište konjugate koji su glikozilovani estarskim vezama, dok dikotiledone vrste skladište konjugate koji su glikozilovani amidnim vezama (Woodward i Bartel, 2005). Kod *A. thaliana* je u proseku zastupljeno 90% konjugata IAA sa amidnim vezama, 10% konjugata IAA sa estarskim vezama i oko 1% slobodne IAA (Woodward i Bartel, 2005).

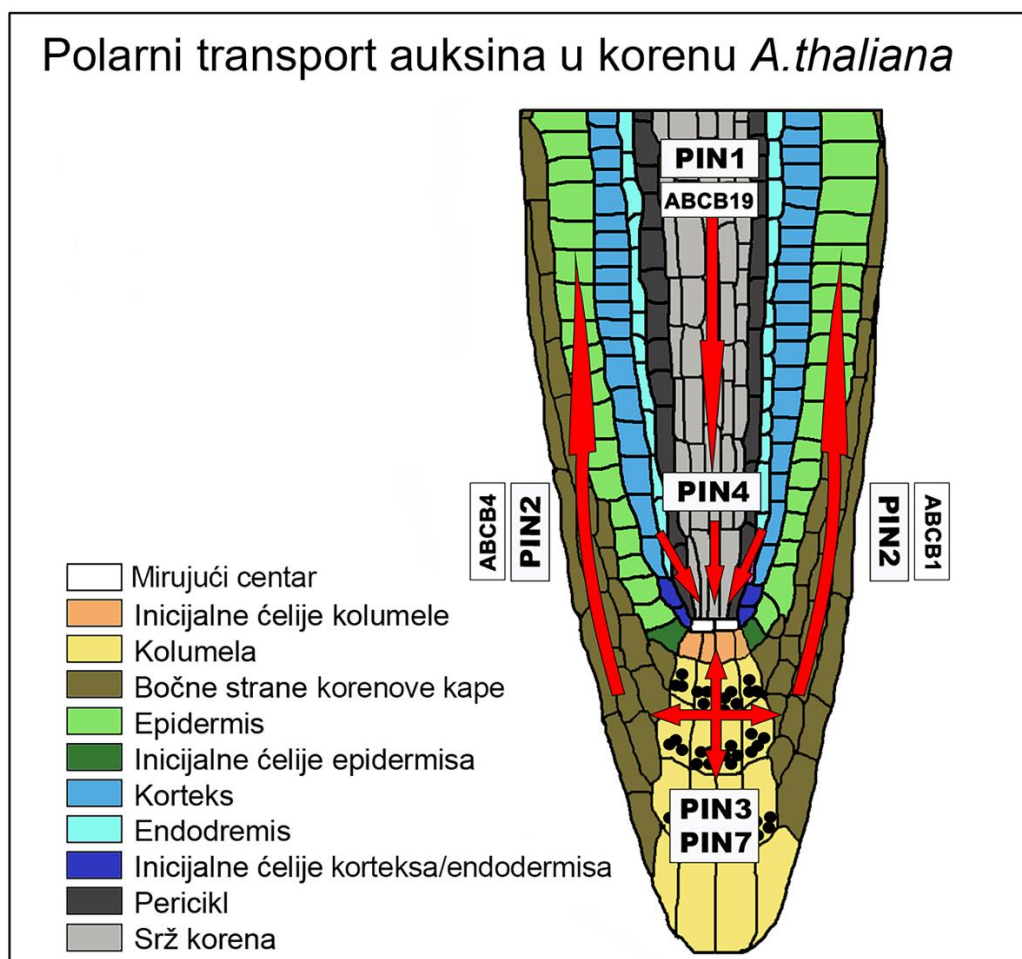
Molekul IAA je izgrađen od indolnog prstena i karboksilne grupe, i poseduje karakteristike slabe organske kiseline. Pri nižim pH vrednostima, karboksilna grupa se protonizuje čineći da molekul bude manje polaran. U ovom obliku (IAA-H), molekul može da difunduje kroz ćelijsku membranu i da se na taj način kreće kroz biljku (**Slika 4**). Suprotno tome, negativno naelektrisana IAA⁻ je previše polarna da bi slobodno difundovala kroz ćelijsku membranu. Ovakav, anjonski oblik IAA se transportuje posredstvom specifičnog mehanizma poznatog kao polarni transport auksina (Feng i sar., 2022).

Slika 4. Šematski prikaz polarnog transporta auksina u ćeliji. U auksinske transportere spadaju PIN-FORMED (PIN), AUXIN RESISTANT1/LIKE AUXIN RESISTANT (AUX1/LAX) i ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B TRANSPORTER (ABCB). Protonovana IAA (IAAH) ulazi u ćelije putem pasivnog transporta (difuzija) i u unutrašnjosti ćelije koja je neutralna ili alkalna, IAAH disosuje na IAA^- i H^+ . Anjon auksina (IAA^-) i H^+ mogu ući u ćelije samo preko transportera za inluks AUX1/LAX. IAA^- može da napusti ćeliju jedino preko transportera za efluks, PIN ili ABCB. Polarna lokalizacija PIN proteina određuje pravac protoka auksina. Neki intracelularni molekuli IAA se mogu transportovati u endoplazmatski retikulum preko nosača PIN5, PIN6 i PIN8 da bi se regulisala homeostaza i metabolizam auksina u ćeliji. PIN protein se može obnoviti endocitozom i ponovo uneti u lipidni dvosloj. Strelice pokazuju pravac toka auksina. Preuzeto iz Feng i sar. (2022).

Polarni transport auksina omogućava aktivan ulazak (influks) i izlazak (efluks) IAA iz ćelije uz pomoć specifičnih auksinskih transportera, i to:

- PIN-FORMED (PIN)
- PIN-LIKES (PILS)
- AUXIN RESISTANT1/LIKE AUXIN RESISTANT (AUX1/LAX)
- ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B TRANSPORTER (ABCB) tj. MULTI-DRUG RESISTANCE/P-GLYCOPROTEIN (MDR/PGP) subfamilija (Zažímalová i sar., 2010).

Auksinski transporteri AUX1/LAX su odgovorni za ulazak auksina u ćelije (influks), dok proteini iz PIN familije (PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7) svojom polarnom lokalizacijom u specifičnim ćelijama omogućavaju akropetalni i bazipetalni protok auksina neophodan za formiranje lokalnih maksimuma ili gradijenata između ćelija (**Slika 5**) (Vieten i sar., 2005; Michniewicz i sar., 2007). PIN5, PIN6, PIN8 i PILS proteini su verovatno uključeni u regulaciju intracelularne auksinske homeostaze (Pěňčík i sar., 2013). Smatra se da su ATP-zavisni ABCB transporteri važni kako za udaljeni transport, tako i za uspostavljanje lokalnog auksinskog gradijenta i formiranje auksinskog maksimuma, odnosno minimuma (Zažímalová i sar., 2010).



Slika 5. Šematski prikaz polarnog transporta auksina u korenu *A. thaliana* na osnovu Vieten i sar. (2005), Michniewicz i sar. (2007) i Geisler i sar. (2017); crvene strelice označavaju pravce protoka auksina. ABCB (ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B TRANSPORTER), PIN (PIN-FORMED).

Polarni transport auksina se odvija u izdanku i korenu, s tim što je u izdanku bazipetalan (prema bazi izdanka), a u korenu najpre akropetalan (od baze korena gde ulazi iz izdanka pa prema

vrhu korena), a zatim bazipetalan kroz kolumelu i lateralne delove korena pomoću PIN2 transportera (**Slika 5**). Najveća koncentracija IAA (auksinski maksimum) se postiže u inicijalnim ćelijama kolumele u vrhovima korena (Friml, 2003), a smanjuje se prema hipokotilu (Clark i sar., 2014). Auksin se takođe proizvodi *in situ*, u vrhu korena, gde se maksimalna sinteza odvija u mirujućem centru i meristemskim ćelijama (Pěňčík i sar., 2013).

Svi transporteri auksina deluju sinergistički, omogućavajući plastičnost korenovog sistema prilikom delovanja različitih sredinskih stimulosa (Sun i sar., 2010; Yuan i sar., 2013; Li i sar., 2015; Yuan i Huang, 2016; Bahmani i sar., 2020) ili alelohemikalija iz zemljišta (Zhang i sar., 2018b; Li i sar., 2019).

1.3.4. Prenos auksinskih signala u ćeliji

Kombinacijom molekularnog, genetičkog i biohemijskog pristupa uspešno je identifikovano nekoliko ključnih komponenti uključenih u prenos auksinskih signala. Rani auksinski odgovori u jedru uključuju aktivaciju transkripcije gena regulisanu putem degradacije proteina represora transkripcije (Guilfoyle i Hagen, 2015). Studije pokazuju da postoji visok stepen raznolikosti i složenosti ovih procesa, uglavnom zbog postojanja multigenskih porodica represora za svaku od glavnih molekulskih komponenti. Na primer, kod *A. thaliana* postoji 29 *Aux/IAA* gena, koji su zaduženi za represiju gena za rane auksinske odgovore (Hagen, 2015).

Geni čiju aktivnost indukuju auksini se dele na grupu ranih gena i grupu kasnih gena. Oni se razlikuju po brzini sinteze proteina nakon delovanja auksina. Rani geni ne zahtevaju prethodnu sintezu transkripcionih faktora, pa se kompleks za inicijaciju transkripcije aktivira neposredno posle vezivanja auksina (Nešković i sar., 2003). Smatra se da su transkripcioni faktori već vezani za odgovarajuće *cis*-elemente u promotorima ranih gena, ali je za njih vezan i jedan represorni protein (*Aux/IAA*) koji sprečava transkripciju. Uloga auksina je da pokrene razgradnju ovog represornog proteina. Proteini ranih gena poseduju signal za transport u jedro, a takođe sadrže domen kojim se vezuju za DNK. Rani geni imaju regulatornu funkciju. Njihovi produkti (mRNK i proteini) regulišu funkcije kasnih gena, čija je aktivnost uključena u morfogenezne procese (Nešković i sar., 2003). Dokaz za to su mutacije u ranim genima, koje su otkrivene kod *A. thaliana*, a koje dovode do morfogenezni aberantnih biljaka (Nešković i sar., 2003).

Biljne ćelije prepoznaju prisustvo auksina na osnovu vezivanja za specifične receptore, kao što su TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) i proteini slični njemu, tzv. AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN 1 - 5 (AFB1-AFB5), kao i AUXIN BINDING PROTEIN (ABP1) (Garay-Arroyo i sar., 2012). TIR1 i AFB1-AFB5 su F-box subjedinice kompleksa ubikvitin ligaze SCF^{TIR1}. Vezivanje auksina za receptore ne dovodi do konformacionih promena, već do stabilizacije interakcija između TIR1 i *Aux/IAA* transkripcionog represora. Ova interakcija rezultira ubikvitinacijom *Aux/IAA* i naknadnom degradacijom od strane proteozoma. Degradacija *Aux/IAA* dovodi do oslobađanja proteina AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF), koji formiraju dimere i regulišu ekspresiju njihovih ciljnih gena (Calderón Villalobos i sar., 2012).

Aktivnost auksina utiče na ekspresiju mnogih gena, kao što je primećeno analizom transkriptoma mRNK (Nešković i sar., 2003). Većina gena na koje utiče auksin sadrži u svom promotoru jedan ili više segmenata specifične sekvence TGTCTC, koje se nazivaju AuxRE elementi

(eng. *auxin responsive elements*) (Nešković i sar., 2003; Calderón Villalobos i sar., 2012). Za AuxRE elemente se vezuju transkripcioni faktori, koji zajedno sa njima učestvuju u inicijaciji transkripcije pri sintezi nove mRNK (Nešković i sar., 2003).

1.3.5. Uloga auksina u regulaciji rastenja i razvića biljaka

Rastenje se kod biljaka definiše kao nepovratno povećanje njihove veličine i mase usled povećanja broja i veličine ćelija (Teale i sar., 2006). Rastenje i razviće biljaka je uslovljeno spoljašnjim i unutrašnjim faktorima. Od unutrašnjih faktora, najvažniji su fitohormoni i genetički faktori, a od spoljašnjih faktora abiotički i biotički činioci kao što su: svetlost, temperatura, dostupnost vode i hranljivih materija, kao i prisustvo ili odsustvo stresa. Mehanizmi kontrole, regulacije i koordinacije procesa rastenja i razvića biljaka se mogu ispoljiti na tri nivoa (Nešković i sar., 2003):

- Intracelularni nivo – podrazumeva regulaciju na nivou nukleinskih kiselina i proteina. Svi faktori koji utiču na replikaciju DNK, transkripciju, translaciju i aktivnost specifičnih enzima utiču i na razviće.
- Intercelularni nivo regulacije (na nivou organizma) se obavlja pomoću posebnih hemijskih supstanci – fitohormona.
- Ekstracelularni nivo podrazumeva induktivno i usmeravajuće delovanje spoljašnjih faktora na razviće.

Auksini učestvuju u regulaciji ćelijske deobe počev od prve deobe zigota, do razvijanja biljnih organa. Aktivnost auksina je fino koordinisana sa drugim molekulima čineći jedan kompleksni sistem koji reguliše rastenje i razviće biljaka.

1.3.5.1. Auksini i njihova funkcija u fiziologiji klijanja

Klijanje predstavlja složen fiziološko-biohemijski proces tokom koga se iz semena razvija nova biljka, a započinje onog trenutka kada seme izađe iz faze dormancije, koja ima ulogu zaštitnog mehanizma, sprečavajući klijanje u nepovoljnim ekološkim uslovima (Bewley, 1997; Fu i sar., 2024). Dormancija je određena genetičkim faktorima, ali i uslovima spoljašnje sredine kao što su svetlost, temperatura, vlažnost i dostupnost hranljivih materija (Graeber i sar., 2012; Arc i sar., 2013; Finch-Savage i Footitt, 2017). Pored toga, mehanički faktori kao što je uklanjanje semenjače takođe mogu da utiču na izlazak iz faze dormantnosti i početak klijanja.

Semena monokotila i dikotila su različito građena. Monokotile sadrže embrion, endosperm i semenjaču. Embrion se sastoji od četiri primarne komponente: korenak (radikula) sa zaštitnom ovojnicom koleorizom, slabo razvijen hipokotil, kotiledon sa skutelumom koji povezuje kotiledon sa endospermom, i stabaoce (epikotil) sa plumulom, obavijeno koleoptilom (Fu i sar., 2024). Za razliku od njih, većina dikotila ne sadrži endosperm, dok embrion čine korenak, hipokotil, dva kotiledona i stabaoce (Nešković i sar., 2003). Semena *A. thaliana* i nekih leguminoza sadrže tanak omotač endosperma, koji ih štiti od preranog klijanja usled visokih temperatura (Piskurewicz i sar., 2023). Semenjača služi kao prirodna barijera koja sprečava ulazak vode i kiseonika, što doprinosi dormanciji semena (Fu i sar., 2024). Nakon što izađu iz faze dormancije, semena *A. thaliana* veoma lako mogu

da proključaju, a za to je dovoljno da imbibuju u vodi (Bewley, 1997). Početak klijanja podrazumeva niz vidljivih razvojnih stadijuma, kao što su pucanje semenjače uz istovremeno pucanje endosperma i izbijanje korenka (Fu i sar., 2024).

Ključnu ulogu u klijanju imaju fitohormoni. Kada nastupe povoljni uslovi, dolazi do aktivacije giberelina, koji dalje promovira klijanje (Bentsink i Koornneef, 2008). Suprotno giberelinima, ABA i IAA utiču negativno na proces klijanja (Bentsink i Koornneef, 2008; Liu i sar., 2013). U većim količinama, auksin inhibira klijanje, odnosno održava dormantnost semena tako što utiče na povećanje sadržaja ABA (Liu i sar., 2013) i na senzitivnost semena prema ovom fitohormonu (Brady i sar., 2003). Ustanovljeno je da tek nakon represije *ARF* gena dolazi do klijanja semena i pravilnog razvoja klijanaca (Liu i sar., 2007). Nakon što se formira klijanac, auksini stimulišu izduživanje epikotila i ubrzavaju rastenje klijanaca (Zhao i sar., 2024).

1.3.5.2. Uloga auksina u razvoju korenovog sistema

U procesu rizogeneze, auksini igraju značajnu ulogu, pre svega u regulaciji deobe ćelija korena, a zatim i u indukciji adventivnih i bočnih korenova (Fukaki i Tasaka, 2009). Najviša koncentracija auksina nalazi se u mirujućem centru, dok su srednje količine auksina karakteristične za umerenu mitotičku aktivnost u vrhu korena (Garay-Arroyo i sar., 2012). Nizak sadržaj auksina u meristemskoj zoni povezan je sa intenzivnim ćelijskim deobama, dok najniži sadržaj auksina označava prestanak ćelijske deobe i početak izduživanja ćelija (Garay-Arroyo i sar., 2012).

Auksini zajedno sa šećerima imaju ključnu ulogu u razviću primarnog i bočnih korenova, kao i apikalnog meristema korena. Glukoza deluje kao ključni signal koji aktivira kinazu TARGET OF RAPAMYCIN (TOR). Ovaj signal pokreće snažnu sveobuhvatnu transkripciju gena vezanih za S-fazu i metaboličke procese poput glikolize, citratnog ciklusa, mitohondrijalnih funkcija i sinteze proteina (Sheen, 2014). Aktivnošću TOR kinaze dolazi do direktne fosforilacije transkripcionog faktora E2 PROMOTER BINDING FACTOR A (E2Fa), čime se omogućava aktivacija gena S-faze koji su neophodni za ćelijsku proliferaciju u apikalnom meristemu korena (Xiong i sar., 2013; Sheen, 2014; Li i sar., 2017).

Pored toga, signalni put TOR utiče i na protein ETHYLENE-INSENSITIVE PROTEIN 2 (EIN2), ključni integrator etilenskog signala. Fosforilacijom EIN2, TOR sprečava njegov transport u jedro, čime povećava ekspresiju E2Fa i pospešuje aktivaciju meristema nezavisno od klasične etilenske signalizacije (Fu i sar., 2021). Pored toga, TOR fosforiliše i stabilizuje PIN2, koji je potreban za uspostavljanje gradijenta auksina i ekspanziju ćelija u primarnom korenu (Yuan i sar., 2020).

U uslovima nedostatka šećera, transkripcioni faktor *bZIP11* (*BASIC LEUCINE-ZIPPER 11*) kontroliše meristem korena indukujući ekspresiju gena *IAA3/SHY2* (*INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 3; SHORT HYPOCOTYL 2*). Poznato je da je *IAA3/SHY2* negativan regulator rastenja korena koji utišava transkripciju auksinskih transportera iz porodice PIN, čime inhibira rastenje korena u uslovima deficita hranljivih materija (Weiste i sar., 2017). Može se zaključiti da šećeri utiču na transport auksina i doprinose formiranju lokalnog auksinskog gradijenta, što se odražava na rastenje i razviće biljaka.

Do inicijacije i razvića primordija bočnih korenova dolazi usled auksinske stimulacije deobe ćelija pericikla, koje formiraju meristemsko ispupčenje usled periklinalnih deoba (Laskowski i sar., 1995; Casimiro i sar., 2001; Benková i sar., 2003; Fukaki i Tasaka, 2009). Transport auksina je od ključne važnosti za pravilno formiranje primordija bočnih korenova. Brasinosteroidi deluju sinergistički sa auksinima tako što promovišu akropetalni transport auksina, čime pospešuju formiranje bočnih korenova (Bao i sar., 2004). Etilen ima dvojako delovanje na razvoj bočnih korenova. Visoke koncentracije etilena i njegovog prekursora 1-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline (ACC) inhibiraju indukciju bočnih korenova i dovode do poremećaja gravitropskog odgovora hipokotila i korena (Negi i sar., 2008). Za razliku od toga, niske koncentracije etilena i ACC stimulišu indukciju bočnih korenova tako što pospešuju sintezu auksina (Ivanchenko i sar., 2008). Citokinini i ABA negativno utiču na formiranje bočnih korenova. Citokinini inhibiraju ekspresiju *PIN* gena za transport auksina i na taj način sprečavaju uspostavljanje auksinskog gradijenta, koji je neophodan za indukciju bočnih korenova (Li i sar., 2006; Laplace i sar., 2007; Kuderová i sar., 2008).

1.3.5.3. Uloga auksina u razvoju nadzemnih organa biljaka

U procesu razvoja nadzemnih organa biljaka aktivira se niz biohemijskih reakcija koje su povezane sa delovanjem svetlosti i fitohormona (Mishra i sar., 2022). Šećeri dobijeni fotosintezom regulišu količinu IAA u biljnim tkivima putem glukozne signalizacije zavisne od heksokinaze i faktora interakcije fitohroma (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR, PIF TF) koji stimuliše transkripciju gena uključenih u biosintezu IAA (Sairanen i sar., 2012). PIF TF fizički interaguje sa fotoreceptorima za crvenu svetlost (Pham i sar., 2018). Na svetlosti, auksin reguliše aktivnost TOR kinaze, preko proteina RHO-RELATED PROTEIN 2 (ROP2). TOR kinaza ima ulogu senzora šećera i energije u fotosintezi, a kada je aktivirana, fosforiliše transkripcione faktore E2Fa i E2Fb u cilju regulisanja aktivnosti meristema izdanaka (Li i sar., 2017). Pored toga, egzogeno dodavanje glukoze promoviše akumulaciju oxIAA i IAA konjugata kao što su IAA-Asp i IAA-Glu, najverovatnije kao rezultat povišenog sadržaja IAA (Sairanen i sar., 2012). Trehaloza 6-fosfat, indikator energetskeg statusa u biljkama, inhibira aktivnost kinaze SUCROSE-NON-FERMENTATION-RELATED PROTEIN KINASE1 (SnRK1), što zauzvrat oslobađa TOR kinazu. Regulator aktivnosti SnRK1 i sadržaja auksina, At5PTaza13 (INOSITOL POLYPHOSPHATE 5-PHOSPHATASE), povezuje signalizaciju auksina i šećera u regulisanju razvoja provodnog tkiva (lisnih nerava) u kotiledonima (Lin i sar., 2005). Nakon što je aktiviran od strane auksina, TOR protein obavlja nekoliko funkcija u rastenju i razviću biljaka, kao što su izbijanje kotiledona, formiranje listova, izduživanje peteljki, cvetanje, starenje i odbrana od stresa (Sheen, 2014).

Auksin utiče i na razvoj bočnih pupoljaka. S obzirom na apikalnu dominaciju, razvoj bočnih pupoljaka je u početku inhibiran. Inicijacija bočnog meristema podrazumeva pravilno pozicioniranje ćelija u meristemu primordije. Računarske analize i modelovanje ukazuju na to da je pravilan raspored primordija oko glavnog apikalnog meristema izdanka rezultat dinamičkih interakcija između već formiranih primordija i onih koje tek treba da se formiraju, uz posredno delovanje PIN1 transportera (de Reuille i sar., 2006; Jonsson i sar., 2006; Smith i sar., 2006). Međutim, značajno je da se biosinteza auksina odvija u veoma specifičnim domenima apikalnih meristema (Tobena-Santamaria i sar., 2002; Cheng i sar., 2006; Gallavotti i sar., 2008). Rezultati genetičkih istraživanja takođe ukazuju na ključnu ulogu biosinteze auksina u formiranju novih bočnih meristema. Na osnovu

toga, verovatno je da biosinteza auksina deluje u skladu sa aktivnošću auskinskih transportera u ovom procesu (Fukaki i sar., 2007).

1.4. REAKCIJE BILJAKA NA STRES

Pod pojmom stresa podrazumeva se niz faktora koji ometaju normalne fiziološke funkcije biljaka, utičući time na procese rastenja i razvića. Ovi faktori obuhvataju nepovoljne uslove sredine, ekstremno visoke ili niske temperature, nedostatak ili višak vode, nedostupnost hranljivih materija, oštećenja izazvana insektima i patogenima, visok salinitet, negativan uticaj hemikalija u životnoj sredini kao što su herbicidi i zagađivači, prisustvo teških metala i alelopatski stres (Mishra i sar., 2023; Varadharajan i sar., 2025).

Smatra se da se prilagođavanje biljaka na stres odvija u nekoliko faza. U ranim fazama, biljka opaža promenu i aktivira mrežu signalnih puteva. U kasnijim fazama pokreće se proizvodnja različitih proteina i drugih jedinjenja, koja ima za cilj da vrati biljku u stanje homeostaze (Shulaev i sar., 2008). Različita jedinjenja uključena su u ove procese, među kojima su: (1) jedinjenja uključena u proces aklimatizacije – antioksidansi i osmoprotektanti; (2) nusprodukti stresa koji nastaju u ćelijama usled narušavanja normalne homeostaze; i (3) molekuli za transdukciju signala uključeni u posredovanje odgovora na aklimatizaciju (Shulaev i sar., 2008). Signalni molekuli mogu biti novosintetisana jedinjenja ili jedinjenja oslobođena iz njihovih konjugovanih oblika, kao što je fitohormon salicilna kiselina (SA) (Shulaev i sar., 2008), kao i različiti nusprodukti metabolizma stresa koji signaliziraju poremećaj ćelijske homeostaze. Druga vrsta signalnih molekula mogu biti nusproizvodi degradacije ćelijske membrane, različite reaktivne kiseonične vrste, kao i oksidovana fenolna jedinjenja ili čak neki antioksidansi (Shulaev i sar., 2008).

Posledice delovanja stresa utiču na morfologiju biljaka i često se ispoljavaju u vidu različitih nepravilnosti u građi korena i izdanaka, odnosno usporavanja procesa rastenja i razvića. Kao rezultat pokušaja da se izbegne delovanje stresora, česte su promene u arhitekturi korena, koje uključuju modifikacije u razvoju primarnih i bočnih korenova, dužini primarnog korena i formiranju korenskih dlačica (Pasternak i sar., 2005). U studijama o fitotoksičnosti različitih biljnih vrsta često se pominju efekti alelohemikalija i fitotoksina prirodnog porekla iz biljaka, kao što su inhibicija rastenja izdanaka koja je povezana sa smanjenjem intenziteta fotosinteze i sadržaja hlorofila, narušavanje enzimske aktivnosti i inhibicija sinteze proteina i ćelijskog disanja (Lopes i sar., 2022). Različiti izvori stresa, uključujući alelopatske, mogu izazvati brojne ultrastrukturne promene u biljnim ćelijama, kao što su: odvajanje ćelijske membrane od ćelijskog zida (Galindo i sar., 1999), nepravilnosti u građi ćelijskog zida (Kaur i sar., 2013; Mitić i sar., 2018), agranulacija citoplazme (Zhou i sar., 2022), oštećenje mitohondrija (Kupidłowska i sar., 1994) i autofagija (Huang i sar., 2019). Alelopatski stres može takođe da izazove ozbiljna oštećenja hloroplasta i fotosintetskog sistema (Xu i sar., 2006; Khaleghi i sar., 2012; Li i sar., 2022; Prasetya i sar., 2022; Sharma i sar., 2022; Xu i sar., 2022; Zahra i sar., 2022).

1.4.1. Oksidativni stres

Odgovor biljaka na alelopatski stres često uključuje oksidativni stres i nekontrolisanu proizvodnju i akumulaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i posledičnu aktivaciju odbrambenog antioksidativnog sistema (Baxter i sar., 2014; Huang i sar., 2019; Mittler i sar., 2022).

Reaktivne kiseonične vrste predstavljaju ključne molekule koji signaliziraju ćelijske odgovore na biotički i abiotički stres i aktiviraju odbrambene mehanizme u biljnim ćelijama (Anjum i sar., 2016). U ROS se ubrajaju: singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$), superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), vodonik-peroksid (H_2O_2) i hidroksil-radikal ($\cdot\text{OH}$), i svi su proizvodi redukcije kiseonika (O_2) u biljnim ćelijama izloženim stresu (Cui i sar., 2022). Pored navedenih, mogu da nastanu i složeni radikali kao što je peroksil-radikal ($\text{ROO}^{\cdot}$), koji nastaje u reakciji $\text{O}_2^{\cdot-}$ i organskih molekula (Rice-Evans, 2001).

Poremećaj homeostaze ROS utiče na funkcionisanje cele biljke. Kada je sadržaj ROS nizak, ćelije su u osnovnom, stabilnom stanju, a ROS može da služi kao sekundarni glasnik uključen u regulaciju funkcija meristemskih ćelija, deobe i diferencijacije ćelija, organogeneze, kao i biotičkih i abiotičkih reakcija. Održavanje nivoa ROS u odgovarajućem opsegu, koji ne prelazi prag između stabilnog i citotoksičnog nivoa, predstavlja ključan proces u biljkama (Anjum i sar., 2016). Kada količina ROS prevaziđe kapacitet antioksidativnog sistema biljaka, dolazi do oksidativnih promena, degradacije lipida u ćelijskim membranama, smanjenja ukupnog sadržaja proteina i trajnih oštećenja ćelija koja mogu dovesti do ćelijske smrti (Anjum i sar., 2016).

U cilju neutralisanja ROS, u biljnim ćelijama se aktiviraju dva sistema odbrane: neenzimski i enzimski antioksidativni sistem. Neenzimski sistem čine različita jedinjenja koja imaju sposobnost uklanjanja ROS kao što su: askorbinska kiselina, glutathion, prolin, neki vitamini, flavonoidi, itd., a u enzimski sistem spadaju antioksidativni enzimi kao što su: superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), peroksidaze (POD) (Anjum i sar., 2016; Cui i sar., 2022).

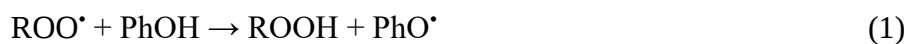
1.4.2. Neenzimske komponente antioksidativnog sistema biljaka

Neenzimske komponente antioksidativnog sistema međusobno se razlikuju po hemijskoj strukturi, rastvorljivosti i mestu delovanja u ćeliji. U zavisnosti od hemijske prirode i fiziološke uloge, ove supstance mogu se svrstati u nekoliko grupa: hidrofilne antioksidanse poput askorbinske kiseline i glutathiona, koji deluju u citosolu i hloroplastima; lipofilne antioksidanse kao što su tokoferoli i karotenoidi, koji štite membrane od lipidne peroksidacije i fenolna jedinjenja uključujući fenolne kiseline i flavonoide, koji imaju izraženu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala i heliranja jona metala.

1.4.2.1. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja su specijalizovani metaboliti široko rasprostranjeni u biljnom carstvu. Predstavljaju značajnu grupu strukturno raznovrsnih jedinjenja kao što su: fenolne kiseline, flavonoidi, tanini, estri hidroksicimetne kiseline i lignin (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011; Afnan i sar., 2022). Pored uloge u odbrani od oksidativnog stresa, ova jedinjenja imaju višestruke funkcije

u biljnim organizmima, kao što su regulacija rastezanja i razmnožavanja, asimilacija hranljivih materija i sinteza proteina, učestvovanje u fotosintezi i formiranju kvaliteta plodova. (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011; Afnan i sar., 2022). Fenolna jedinjenja su takođe jedna od najčešćih grupa alelohemikalija u ekosistemu, pri čemu su fenolne kiseline i flavonoidi opširno proučavane grupe sa alelopatskim efektima (Hoang Anh i sar., 2021). Zbog strukturnih karakteristika, kao što su prisustvo fenolnih –OH grupa i aromatičnog prstena, fenoli imaju visok potencijal za neutralizaciju slobodnih radikala. U određenim model-sistemima pokazali su veću antioksidativnu efikasnost od standardnih neenzimskih antioksidanasa poput tokoferola i askorbinske kiseline (Costa i sar., 2021). Njihova efikasnost zasniva se na više mehanizama: (1) visokoj reaktivnosti koja potiče iz njihove sposobnosti da doniraju vodonikove atome i elektrone; (2) mogućnosti prekidanja lančanih reakcija (eng. *chain-breaking function*), zahvaljujući stabilizaciji i delokalizaciji nesparenih elektrona u nastalim fenoksi-radikalima; i (3) sposobnosti heliranja jona prelaznih metala, čime se inhibira završna faza Fentonove reakcije ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$) (Costa i sar., 2021). Fenolni antioksidansi (PhOH) ometaju oksidaciju lipida i drugih molekula brzim doniranjem atoma vodonika radikalima u sledećoj reakciji:



Nastali fenoksi radikali (PhO $\cdot$) su relativno stabilni, tako da ne iniciraju dalje radikalske reakcije. Oni čak deluju kao terminatori lančane reakcije u interakciji sa drugim slobodnim radikalima. Međutim, pod određenim uslovima, na primer usled visoke koncentracije fenolnih antioksidanata, prisustva redoks aktivnih metala kao što su bakar i gvožđe, i visoke pH vrednosti, mogu da se ponašaju kao prooksidansi (Simić i sar., 2007).

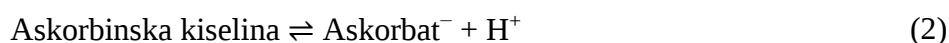
Najviše izučavana grupa fenolnih jedinjenja u pogledu antioksidativne aktivnosti su flavonoidi. Često su prisutni u listovima, cvetovima i polenu (Ahmad i sar., 2009). U zavisnosti od položaja C-prstena u njihovoj strukturi, flavonoidi su podeljeni u nekoliko podgrupa: izoflavoni, flavoni, flavonoli, flavononi, antocijani i halkoni (Panche i sar., 2016). Otkriveno je preko 10 000 različitih flavonoida, među kojima su najpoznatiji antocijani, kvercetin, kempferol, luteolin, apigenin, katehol i drugi (Agati i sar., 2012). Flavonoidi su najčešće uskladišteni u vakuoli u glikozilovanoj formi. Takođe, oni su često prisutni u formi eksudata na površini listova i ostalih nadzemnih delova biljaka (Ahmad i sar., 2009).

Sinteza flavonoida se obavlja fenilpropanoidnim ili acetat-malonatnim putem (Weston i Mathesius, 2013). Faktori abiotičkog stresa najčešće povećavaju sintezu flavonoida u biljkama, što dovodi do povećanja njihovog antioksidativnog kapaciteta (Waśkiewicz i sar., 2014). U slučaju ozbiljnijeg stresa, često dolazi do inaktivacije antioksidativnih enzima, pa flavonoidi služe kao osnovna strategija odbrane (Agati i sar., 2012). Oni imaju važnu ulogu u odbrani od oksidativnog stresa tako što uklanjaju hidroksil-radikale i singletni kiseonik (Anjum i sar., 2016). Zahvaljujući svom redukcionom potencijalu, veoma su efikasni inhibitori lipidne peroksidacije. Mnogi od njih imaju ulogu inhibitora enzima lipoksigenaze, koji konvertuje polinezasićene masne kiseline u derivate koji sadrže kiseonik (Nijveldt i sar., 2001). Flavonoidi imaju sposobnost da menjaju kinetiku peroksidacije tako što smanjuju fluidnost membrana, što može da ometa difuziju ROS i ograniči peroksidne reakcije (Waśkiewicz i sar., 2014).

Kvercetin i njegovi derivati poseduju sposobnost da formiraju komplekse sa jonima metala kao što su bakar i gvožđe, što sprečava nastanak hidroksil-radikala putem Fentonove reakcije (Agati i sar., 2012). Pored toga, oni učestvuju i u redukciji već formiranih ROS (Agati i sar., 2012).

1.4.2.2. Askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina (vitamin C, eng. *ascorbic acid*, AsA) (**Slika 6A**) ubraja se među najviše istraživane neenzimske komponente antioksidativnog sistema biljaka. Uglavnom je zastupljena u redukovanom obliku, kao askorbat i nalazi se u svim delovima biljaka, pogotovo u zrelim listovima koji su fotosintetski najaktivniji.



Oko 30 – 40% ukupnog askorbata nalazi se u hloroplastima i stromi u koncentracijama do 50 mM (Foyer i Noctor, 2005). Askorbat se sintetiše u mitohondrijama i transportuje u ostale delove ćelije i u apoplast (Smirnoff i Wheeler, 2000).

Askorbinska kiselina učestvuje u brojnim fiziološkim procesima biljaka, uključujući regulaciju rastanja, razvića i metabolizma, pri čemu je njena glavna uloga u odbrani od oksidativnog stresa. Askorbat redukuje i uklanja mnoge ROS kao što su singletni kiseonik, superoksid anjon radikal i hidroksil-radikal (Thomas i sar., 1992). Askorbat-glutationski ciklus, koji se još naziva Halivel-Asada ciklus, je metabolički put koji detoksikuje vodonik-peroksid, koji nastaje kao nusproizvod u metaboličkim procesima. Prvi korak ovog ciklusa je redukcija vodonik-peroksida do vode uz pomoć askorbat peroksidaza, koje koriste askorbat kao donor elektrona (Noctor i Foyer, 1998). Tom prilikom se askorbat oksiduje u stabilan monodehidroaskorbil-radikal (MDHA[•]), koji se zatim redukuje uz pomoć MDHA-reduktaze, koja je lokalizovana u mitohondrijama, hloroplastima, citoplazmi i mikrotelima do askorbata uz potrošnju NADPH (Asada, 1999; Smirnoff i Wheeler, 2000). U drugom slučaju, MDHA[•] spontano prelazi u dehidroaskorbat (DHA), koji se redukuje u askorbat uz pomoć DHA-reduktaze uz utrošak glutaciona (GSH), čime se formira oksidovani glutation (GSSG). On se redukuje uz pomoć glutation-reduktaze, uz pomoć NAD(P)H kao donora elektrona (Nešković i sar., 2003; Ahmad i sar., 2009).

Askorbinska kiselina može direktno ukloniti slobodne radikale i regenerisati α -tokoferol (vitamin E) iz tokoferoksil-radikala, obezbeđujući tako zaštitu ćelijske membrane (Thomas i sar., 1992). AsA takođe deluje kao kofaktor za sintezu enzima violaksantin-deepoksidaze (odnosno violaksantin:askorbat oksidoreduktaze), koji zajedno sa zeaksantin-epoksidazom formira deo ksantofilnog (ili violaksantinskog) ciklusa za kontrolu koncentracije zeaksantina u hloroplastima, i na taj način kontroliše učestalost ekscitacije reakcionih centara fotosistema (Smirnoff, 2000).

1.4.2.3. Glutation

Glutation (**Slika 6B**) je tripeptid glutaminske kiseline (γ -glutamil-cisteinil-glicin) i predstavlja glavni izvor neproteinskih tiola u većini biljnih ćelija. Aktivni deo u strukturi glutatona predstavlja tiolna grupa (-SH), koja je reaktivna i učestvuje u mnogim biohemijskim procesima (Ahmad i sar., 2009). Tiol ima afinitet vezivanja za pozitivno naelektrisane elemente (nukleofilan je), što mu omogućava da formira jake veze sa metalima. U biljnim ćelijama je dominantno prisutan u redukovanom obliku (GSH), a najveća koncentracija glutatona je pronađena u hloroplastima (1 - 4 mM) (Ahmad i sar., 2009; Waśkiewicz i sar., 2014). Prisutan je i u citoplazmi, vakuoli, mitohondrijama, peroksizomima, endoplazmatičnom retikulumu i apoplastu (Waśkiewicz i sar., 2014).

Glutation funkcioniše kao antioksidans na nekoliko načina. U askorbat-glutationskom ciklusu, GSH utiče na redukciju DHA u askorbat, kako enzimski tako i neenzimski, pri čemu se i sam oksiduje u GSSG. Nakon toga se regeneriše uz pomoć glutation reduktaze, a NADPH je glavni donor elektrona. Centralni nukleofilni cisteinski ostatak je odgovoran za visok redukcionu potencijal GSH (May i sar., 1998). Zahvaljujući njemu, GSH uklanja vodonik-peroksid i reaguje neenzimski sa drugim ROS: singletnim kiseonikom, superoksidanjon- i hidroksil-radikalima (Ahmad i sar., 2009; Waśkiewicz i sar., 2014). Centralna uloga GSH u antioksidativnoj odbrani potiče od njegove sposobnosti da regeneriše drugi moćni antioksidans, askorbat preko askorbat-glutationskog ciklusa (Nešković i sar., 2003; Ahmad i sar., 2009; Waśkiewicz i sar., 2014). Na taj način su glutation i askorbat povezani. Takođe, glutation ima sposobnost da detoksikuje herbicide konjugacijom i da inaktivira ksenobiotike koristeći ih kao supstrate za glutation-S-transferazu i delujući kao prekursor fitohelatina, koji formiraju komplekse sa toksičnim teškim metalima (Waśkiewicz i sar., 2014). Fitohelatini su oligomeri glutatona, koji nastaju delovanjem enzima fitohelatin-sintaze. Oni deluju kao helatori i važni su za detoksikaciju teških metala. Sintetišu se u citoplazmi, gde se vezuju za teške metale, a zatim se transportuju kroz tonoplast delovanjem ATP-vezujućeg transportera (Kumar, 2025). GSH takođe učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa, ćelijske deobe, diferencijacije i senescencije (Waśkiewicz i sar., 2014).

1.4.2.4. Prolin

Prolin (**Slika 6C**) je neesencijalna, ciklična amino-kiselina, čija je struktura definisana pirolidinskim prstenom nastalim povezivanjem bočnog lanca sa amino-grupom. Ova jedinstvena konformacija ograničava fleksibilnost polipeptidnog lanca i čini prolin važnim stabilizatorom proteinskih struktura (Lehmann i sar., 2010). Kod biljaka, prolin se posebno ističe u uslovima abiotičkog stresa, gde njegova akumulacija doprinosi osmoprotekciji, stabilizaciji membrana i ublažavanju oksidativnih oštećenja, čime igra ključnu ulogu u adaptaciji i preživljavanju biljnih ćelija (Bohnert i sar., 1995; Sleator i Hill, 2002).

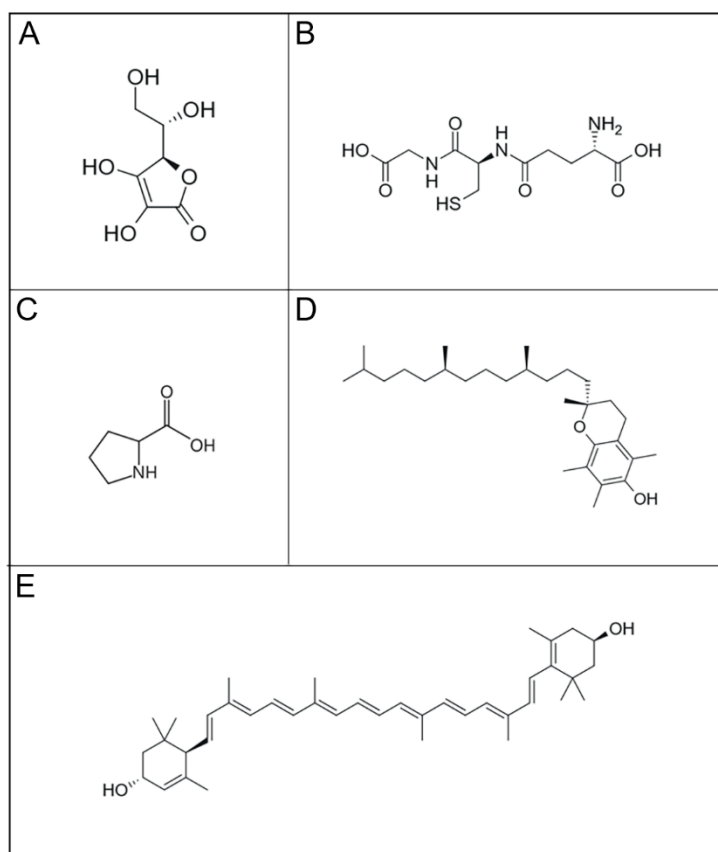
U formi slobodne aminokiseline, prolin predstavlja jednu od najšire rasprostranjenih zaštitnih faktora koji se akumuliraju u biljkama, bakterijama, protozoama i morskim beskičmenjacima u nepovoljnim uslovima životne sredine kao što su suša, visok salinitet, niske i visoke temperature, prisustva teških metala i patogena, anaerobioze, nedostatka hranljivih materija, atmosferskog

zagađenja i UV zračenja (Saradhi i sar., 1995; Hare i Cress, 1997; Siripornadulsil i sar., 2002). Nivo akumulacije prolina u biljkama je *species*-specifičan i zavisi od intenziteta i vrste stresa, a u pojedinim slučajevima može biti i do 100 puta veći nego kod biljaka koje rastu u kontrolnim uslovima (Verbruggen i Hermans, 2008).

Prolin se sintetiše u meristemskim i u reproduktivnim tkivima biljke (Lehmann i sar., 2010). Tokom razvoja biljnog organizma u odsustvu stresa, količina slobodnog prolina varira među biljnim organima. Najveće količine prolina se nalaze u cvetovima, posebno u polenovim zrnima i u semenu, a najmanje u korenu. Sadržaj prolina u listovima zavisi od starosti biljke, položaja ili dela lista (Verbruggen i sar., 1993; Chiang i Dandekar, 1995). Količina prolina u ćelijama, tkivima i biljnim organima je regulisana međusobnim delovanjem biosinteze, razgradnje i procesa unutarćelijskog i vanćelijskog transporta. Prolin je posebno značajan za brzo obnavljanje ćelijske homeostaze tokom oporavka od osmotskog stresa. Tokom oporavka, akumulirani prolin se brzo oksiduje u glutamat (Blum i Ebercon, 1976). Pored svoje uloge u osmoprotekciji, akumulacija prolina u biljkama ima ulogu i u skladištenju energije i azota, kao i povećanju redukcijske moći (Blum i Ebercon, 1976), što sve zajedno doprinosi brzom obnavljanju ćelijske homeostaze.

1.4.2.5. Tokoferoli

Tokoferoli (vitamin E) (**Slika 6D**) su antioksidansi koji se nalaze u svim delovima biljaka. Postoji četiri izomera, α , β , γ i δ , od kojih su α -tokoferoli biološki najaktivniji (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996). Upravo su α -tokoferoli dominantni antioksidansi u membranama hloroplasta i oni imaju najveću zaslugu u zaštiti hloroplasta od fotooksidativnih oštećenja. Tokoferoli imaju sposobnost uklanjanja singletnog kiseonika. Fahrenholz i saradnici (1974) su procenili da jedan molekul α -tokoferola može da neutrališe 120 molekula singletnog kiseonika. α -Tokoferoli takođe funkcionišu kao reciklabilni terminatori lančane reakcije radikala polinezasićenih masnih kiselina nastalih oksidacijom lipida (Ahmad i sar., 2009). Oni uklanjaju lipidne peroksi-radikale i stvaraju tokoferoksilni radikal koji se može reciklirati u odgovarajući α -tokoferol reakcijom sa askorbatom ili drugim antioksidansima (Thomas i sar., 1992).



Slika 6. Neenzimske komponente antioksidativnog sistema biljaka: **A** – askorbinska kiselina; **B** – glutation; **C** – prolin; **D** – tokoferol; **E** – karoten. Strukturne formule su konstruisane u softveru *Marvin* (Chemaxon Ltd, Budimpešta, Mađarska).

1.4.2.6. Karotenoidi

Karotenoidi (**Slika 6E**) su biljni pigmenti koji se nalaze u listovima, cvetovima, plodovima, korenovima i semenima, i daju im žutu, narandžastu ili crvenu boju (Waśkiewicz i sar., 2014; Langi i sar., 2018). Po hemijskoj strukturi su izoprenoidi. Većina ovih jedinjenja se sastoji od osam izoprenoidnih jedinica, povezanih na specifičan način (Langi i sar., 2018). Imaju ulogu u apsorbovanju svetlosti, fotosintezi i zaštiti hlorofila od fotooštećenja (Waśkiewicz i sar., 2014). Karotenoidi su podeljeni u dve grupe: karotene i ksantofile. U karotene spadaju α -karoten, β -karoten (prekursor vitamina A) i likopen. U ksantofile spadaju zeaksantin, lutein, kapsantin, violaksantin, kriptoksantin i neoksantin (Langi i sar., 2018). I karoteni, i ksantofili su ugljovodonici, ali ksantofili sadrže hidroksil-grupu i keto-grupu na kraju prstena, zbog čega su polarniji (Langi i sar., 2018).

Pored toga što štiti od štetnog delovanja UV zračenja, β -karoten ima važnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa. Zahvaljujući sistemu konjugovanih dvogubih veza, β -karoten ima odličnu sposobnost da neutrališe singletni kiseonik, kao i da brzo reaguje sa slobodnim radikalima kao što su peroksil-, hidroksil- i superoksid anjon radikali (Stahl i Sies, 2003). U dovoljno visokim koncentracijama, karotenoidi mogu da zaštite lipide od peroksidnih oštećenja. S obzirom da su lipofilni, β -karoten i α -tokoferol mogu sinergistički da učestvuju u odbrani od oksidativnog stresa,

tako što karoten potpomaže u uklanjanju radikala nastalih u reakciji sa tokoferolima (Waśkiewicz i sar., 2014).

1.4.3. Enzimske komponente antioksidativnog sistema biljaka

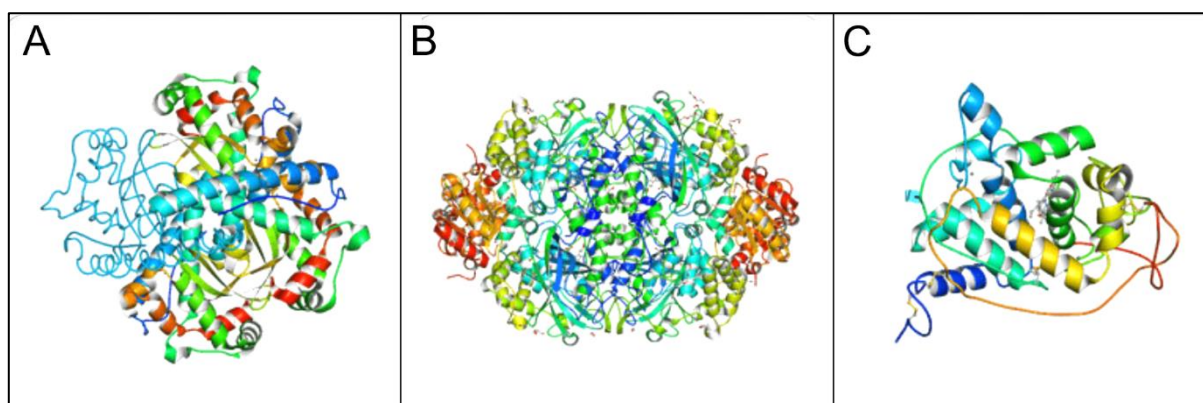
1.4.3.1. Superoksid-dismutaze

Superoksid-dismutaze (Slika 7A) predstavljaju jednu od najvažnijih enzimskih komponenti antioksidativnog sistema biljaka. Glavna uloga ovih enzima je da zaštiti ćelije od oksidativnog stresa katalizujući reakciju dismutacije dva molekula $O_2^{\bullet -}$ do H_2O_2 i O_2 (Shams i sar., 2024). Vodonik-peroksid se zatim razgrađuje na različite načine uz pomoć drugih enzimskih i neenzimskih komponenti. Tako su krajnji produkti reakcije katalaza kiseonik i voda, dok delovanjem peroksidaza nastaju molekuli vode i oksidovani produkti reakcije (Anjum i sar., 2016; Shams i sar., 2024). Sva tri enzima – katalaze, peroksidaze i superoksid-dismutaze – međusobno su funkcionalno povezana.

Superoksid-dismutaze pripadaju grupi metaloenzima, koji sadrže jone metala u svojoj molekulskoj strukturi. Na osnovu vrste metalnog kofaktora, razlikujemo nekoliko tipova superoksid-dismutaza: bakar-cink-SOD (CuZn-SOD), mangan-SOD (Mn-SOD), gvožđe-SOD (Fe-SOD) i nikel-SOD (Ni-SOD). Izoforme CuZn-SOD, Mn-SOD i Fe-SOD se nalaze u biljkama i algama, dok je Ni-SOD karakterističan za cijanobakterije. Različiti tipovi SOD su smešteni u određenim delovima ćelije u kojima obavljaju svoju funkciju (Shams i sar., 2024). U *A. thaliana*, CuZn-SOD se nalaze u hloroplastima, citoplazmi i međućelijskom prostoru. Njihova uloga je da uklanjaju $O_2^{\bullet -}$ iz hloroplasta koji nastaju kao nusprodukt fotosinteze i disanja, i usled abiotičkog stresa. Ekstracelularna CuZn-SOD u apoplastu štiti ćelijsku membranu od oksidativnih oštećenja i doprinosi lignifikaciji ćelijskog zida. Mn-SOD se nalaze u mitohondrijama, peroksisomima i apoplastu. Ovi enzimi štite mitohondrijalnu DNK i proteine od oksidativnog oštećenja izazvanog delovanjem $O_2^{\bullet -}$ koji nastaju u elektron-transportnom lancu. Pored toga, Mn-SOD zajedno sa POD učestvuju u generisanju $^{\bullet}OH$ radikala iz H_2O_2 u ćelijskom zidu (Kukavica i sar., 2009). Fe-SOD se nalazi u hloroplastima i njihova uloga je da uklone $O_2^{\bullet -}$ koji nastaje u fotosistemima PSI i PSII (Alscher i sar., 2002; Marques i sar., 2014; Mishra i Sharma, 2019; Zhou i sar., 2022).

Superoksid-dismutaze se sastoje od proteinskih subjedinica koje čini od 150 do 220 amino-kiselina, a koje su vezane u proteinske komplekse u obliku homodimera, tetramera i heksamera. Ove subjedinice su važne za funkcionalno povezivanje sa metalnim komponentama. Tako npr. CuZn-SOD ima više subjedinica, od kojih svaka sadrži jone cinka i bakra. Bakar ima ključnu ulogu u katalitičkoj aktivnosti enzima, dok cink stabilizuje njegovu strukturu i doprinosi očuvanju funkcionalnosti aktivnog mesta. (Rakhit i Chakrabartty, 2006; Perry i sar., 2010; Mishra i sar., 2014; Mondola i sar., 2016; Mishra i Sharma, 2019; Tyagi i sar., 2019). Kod CuZn-SOD, vezivanje $O_2^{\bullet -}$ odvija se u katalitičkom centru koji prolazi kroz smenu oksidovanog i redukovano stanja tokom oksido-redukcionih reakcija, čime se održava efikasnost enzima nezavisno od oksidacionog stanja (Shams i sar., 2024). Ova sposobnost je potvrđena kod svih izoformi superoksid-dismutaza. Kod CuZn-SOD su karakteristične dve oksido-redukcione reakcije koje katalizuje jon bakra: 1) Cu^{2+} se redukuje do Cu^{1+} , dok se $O_2^{\bullet -}$ oksiduje do molekula kiseonika; 2) Cu^{1+} se oksiduje ponovo do Cu^{2+} , dok se drugi molekul $O_2^{\bullet -}$ redukuje do vodonik-peroksida (Timari i sar., 2011). Fe-SOD deluje na sličan način, s tim da Fe^{3+} prelazi u Fe^{2+} i obrnuto. Ukoliko je u aktivnom delu superoksid-dismutaza prisutno

trovalentno gvožđe, enzim deluje kao oksidujući agens, što dovodi do produkcije kiseonika. Međutim, u slučaju dvovalentnog gvožđa, ovaj enzim ima redukujuću ulogu, tako da dolazi do produkcije vodonik-peroksida. Kod Mn-SOD, $O_2^{\bullet -}$ se direktno vezuje za metalnu komponentu enzima. Nakon što se prvi molekul $O_2^{\bullet -}$ oksiduje do molekula kiseonika, drugi molekul se redukuje do vodonik-peroksida (Srncic i sar., 2009). U slučaju Ni-SOD, tokom oksido–redukcionog ciklusa dolazi do promene oksidacionih stanja Ni^{3+} u Ni^{2+} , pri čemu se razmenjuje jedan elektron. Struktura enzima olakšava ovaj proces zahvaljujući koordinacionom okruženju koje obuhvata $Ni(II)$ – $S(H^+)$ –Cys(6) jedinicu i molekul vode (Prabhakar i sar., 2006; Shearer i sar., 2014). Molekul vode stabilizuje jonske promene na metalnom centru i omogućava efikasniji protonski transfer, dok Cys6 ostatak ima ključnu ulogu u vezivanju $O_2^{\bullet -}$ i formiranju vodonik-peroksida (Prabhakar i sar., 2006; Shearer i sar., 2014).



Slika 7. Enzimske komponente antioksidativnog sistema biljaka: **A** – superoksid-dismutaza (SOD); **B** – katalaza (CAT); **C** – peroksidaza (POD).

1.4.3.2. Katalaze

Katalaze (**Slika 7B**) su prvi otkriveni antioksidativni enzimi (Mhamdi i sar., 2010). One se sastoje od polipeptida mase 50-70 kDa, koji su organizovani u tetramere, tako da svaki monomer sadrži hem prostetičku grupu (Regelsberger i sar., 2002). Hem grupa je neproteinski element porfirinske građe, koji ima ulogu donora elektrona u katalitičkim reakcijama.

Katalaze omogućavaju razgradnju vodonik-peroksida putem dismutacije, pri čemu se dva molekula H_2O_2 prevode u vodu i molekularni kiseonik. U katalitičkim reakcijama od jednog molekula vodonik-peroksida nastaje kiseonik, a od drugog nastaju dva molekula vode u različitim etapama. Oba antioksidativna enzima, katalaze i peroksidaze, deluju tako što raskidaju vezu između dva molekula kiseonika u vodonik-peroksidu i formiraju prvi molekul vode uz istovremenu sintezu oksoferil komponente i porfirin-katjon radikala (Kato i sar., 2004).

Katalaze se uglavnom nalaze u peroksizomima. One su prisutne u različitim tipovima peroksizoma u listovima, kotiledonima, korenu, zatim u glioksizomima i nespecijalizovanim peroksizomima (Anjum i sar., 2016). Neki autori izveštavaju o prisustvu katalaza u mitohondrijama, npr. kod kukuruza (Scandalios i sar., 1980).

Kod vrste *A. thaliana* postoje tri klase katalaza (I-III), koje odgovaraju genima *CAT1*, *CAT2* i *CAT3* (Willekens i sar., 1995; Iwamoto i sar., 2000). *CAT1* i *CAT3* se nalaze na hromozomu 1, a

CAT2 na hromozomu 4 (Frugoli i sar., 1996). CAT1 je u korelaciji sa klasom III, CAT2 sa klasom I, a CAT3 sa klasom II (Iwamoto i sar., 2000). Katalaze klase I se eksprimiraju isključivo u fotosintetskim tkivima, dok su katalaze II klase povezane sa vaskularnim tkivima. Katalaze III klase su karakteristične za semena i reproduktivna tkiva (Willekens i sar., 1995). To znači da se gen CAT1 najčešće eksprimira u polenu i semenima, CAT2 u fotosintetskim tkivima, a CAT3 u vaskularnim tkivima. U rozetama zrelih biljaka *A. thaliana* su zastupljena sva tri transkripta, s tim da je CAT1 najređi (Frugoli i sar., 1996; McClung, 1997). Aktivnost katalaza klase I i II je povezana sa cirkadijalnim ritmom (Redinbaugh i sar., 1990; Zhong i sar., 1994).

1.4.3.3. Peroksidaze

Peroksidaze (Slika 7C) su uključene u mnoge fiziološke procese tokom životnog ciklusa biljaka, kao što su metabolizam auksina, formiranje lignina i suberina, unakrsno povezivanje komponenti ćelijskog zida, biosinteza fitoaleksina, metabolizam reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, rastenje i sazrevanje plodova i odbrana od patogena (Almargo i sar., 2009; Pandey i sar., 2017; Veljović Jovanović i sar., 2018). Peroksidaze imaju veći afinitet prema vodonik-peroksidu u odnosu na katalaze i koriste askorbat kao specifični donor elektrona za redukciju vodonik-peroksida do molekula vode u ćelijskim strukturama, kao što su hloroplasti, mitohondrije, citoplazma i peroksizomi (Anjum i sar., 2016). Reakcija peroksidaza može da se prikaže na sledeći način:



Tokom reakcije peroksidaza dolazi do redukcije vodonik-peroksida uz oksidaciju supstrata koji može biti fenolne ili nefenolne strukture i označava se sa RH. Tom prilikom nastaju dva molekula vode i dva oksidovana produkta reakcije (Pandey i sar., 2017; Veljović Jovanović i sar., 2018).

Redukcija oksoferil komponente kod peroksidaza se, kao i kod katalaza, odvija kroz dva uzastopna jednoelektronska transfera, s tim što se kod peroksidaza tokom ovog procesa oksiduju organski supstrati, što dovodi do generisanja dva slobodna radikala (kao što je npr. monodehidroaskorbat kod askorbat peroksidaza) (Kato i sar. 2004; Alfonso-Prieto i sar., 2009).

Peroksidaze su klasifikovane u dve grupe u zavisnosti od toga da li poseduju hem prostetičku grupu (Passardi i sar., 2007). Peroksidaze koje nemaju hem grupu (manje od 20%), kao što su tiol-peroksidaze, alkilhidro-peroksidaze, NADH-peroksidaze, zastupljene su u manjem broju. Što se tiče većinskih, hem-peroksidaza, one su dalje podeljene u dve velike podfamilije: 1) peroksidaze-ciklooksigenaze (PCOX) i 2) peroksidaze-katalaze (PCAT). PCOX su karakteristične za animalne ćelije, a PCAT za neanimalne ćelije. PCAT su takođe klasifikovane u tri klase, slično katalazama, s tim da je za biljno carstvo karakteristična klasa III (Hiraga i sar., 2001; Tognolli i sar., 2002). Ovoj grupi pripadaju peroksidaze rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP), kikirikija (eng. *peanut peroxidase*, PNP), soje (eng. *soybean peroxidase*, SBP) itd. (Cosio i Dunand, 2009). U genomu *A. thaliana* pronađeno je 73 gena za peroksidaze (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Peroksidaze klase III sadrže u svojoj strukturi N-terminalne signalne peptide, četiri disulfidna mosta i jone kalcijuma. Askorbat peroksidaze pripadaju klasi I, one se nalaze u mnogim eukariotskim neanimalnim organizmima uključujući i više biljke (Sharp i sar., 2003; Kangasjärvi i sar., 2008). Ovaj enzim je prvi put pronađen u grašku i lociran je u različitim odeljcima ćelije kao što su citoplazma,

mitohondrije, mikrotela (peroksizomi i glioksizomi) i hloroplasti (Anjum i sar., 2016). Optimalna pH vrednost za askorbat peroksidazu je između 7 i 8. U odsustvu askorbinske kiseline, izoenzimi askorbat peroksidaze su nestabilni (Anjum i sar., 2016).

U biljnim ćelijama homeostaza vodonik-peroksida primarno je regulisana enzimskom aktivnošću katalaza i peroksidaza. Katalitička aktivnost POD obuhvata tri različita mehanizma: peroksidativni, oksidativni i hidroksilni ciklus (Veljović Jovanović i sar., 2018). Pored konvencionalne uloge u eliminaciji H_2O_2 i oksidaciji fenolnih jedinjenja u okviru peroksidativnog ciklusa, POD poseduju kapacitet za *de novo* generisanje H_2O_2 putem jednoelektronske redukcije molekulskog kiseonika. Ovaj oksidativni ciklus podrazumeva transfer jednog elektrona sa redukujućeg supstrata (poput NADH ili fenolnih kofaktora) na O_2 , pri čemu se $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 formiraju kao intermedijeri (Veljović Jovanović i sar., 2018).

Nadalje, interakcija sa $O_2^{\cdot-}$ prevodi feril-oblik peroksidaze ($Fe_4^+=O$, ekvivalent Jedinjenja II) u reverzibilno inaktivisano Jedinjenje III (perferil-oblik, $Fe_3^+-O_2^{\cdot-}$). Tokom hidroksilnog ciklusa, u prisustvu supstrata i H_2O_2 , Jedinjenje III indukuje reakcije nalik Fentonovoj, generišući visokoreaktivne hidroksilne radikale ($\cdot OH$).

Konačno, fukcionalna divergencija između CAT i POD determinisana je njihovim kinetičkim svojstvima, odnosno afinitetom prema supstratu. Dok CAT odlikuje visok kapacitet i nizak afinitet, što omogućava brzu detoksikaciju velikih količina H_2O_2 , POD poseduju visok afinitet prema supstratu i vrše finu modulaciju intracelularne koncentracije ovog molekula (Anjum i sar., 2016).

Peroksidaze igraju važnu ulogu u katabolizmu auksina putem oksidativne karboksilacije IAA (Pandey i sar., 2017). One učestvuju u oksidaciji auksina na više načina: konvencionalnim putem zavisnim od vodonik-peroksida ili putem nezavisnim od vodonik-peroksida i zavisnim od kiseonika. Biljne peroksidaze imaju domene slične auksin-vezujućim proteinima (eng. *Auxin Binding Protein*, ABP) (Gazaryan i sar., 1996). Eksperimenti su pokazali da povećana ekspresija gena za peroksidaze dovodi do smanjenja sadržaja IAA, povećane tolerancije na UV zračenje, smanjene indukcije bočnih korenova i zatvaranja stoma kod duvana, a da smanjena ekspresija dovodi do povećanog sadržaja IAA, brzog rastenja izdanaka, sraslih listova i rane pojave cvetanja (Jansen i sar., 2001).

2. CILJEVI RADA

Naučni cilj doktorske disertacije je procena fitotoksičnih efekata floretina i utvrđivanje fizioloških mehanizama njegovog delovanja kod model-biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., sa posebnim osvrtom na njegovu potencijalnu upotrebljivost u razvoju ekološki prihvatljivih bioherbicida. Postavljeni naučni cilj disertacije realizovan je kroz nekoliko podciljeva:

- Procena fitotoksičnog delovanja floretina na rastenje, razviće i morfološke karakteristike juvenilnih biljaka *A. thaliana* u kulturi *in vitro*; određivanje srednje inhibitorne (IC_{50}), maksimalne efektivne i radne koncentracije floretina;
- Elektrofiziološka analiza efekta floretina na membranu epidermalnih ćelija korena juvenilnih biljaka;
- Utvrđivanje efekata floretina na histološku organizaciju i ultrastrukturne karakteristike ćelija tretiranih juvenilnih biljaka;
- Analiza uticaja floretina na sadržaj fotosintetskih pigmenata;
- Ispitivanje efekata floretina na metabolizam i distribuciju auksina u tretiranim juvenilnim biljkama;
- Procena uticaja floretina na antioksidativni status juvenilnih biljaka praćenjem aktivnosti/sadržaja neenezimskih i enzimskih komponenti antioksidativnog sistema, kao i primenom *in vitro* i *in silico* analiza enzimske kinetike;
- Analiza stabilnosti floretina u hranljivim podlogama;
- Ispitivanje procesa usvajanja i metabolisanja floretina u tretiranim juvenilnim biljkama.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL I USLOVI GAJENJA *in vitro*

3.1.1. Gajenje biljaka *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. radi prikupljanja semena

Za potrebe eksperimenata ove doktorske disertacije korišćena su semena model-biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ekotipa Columbia (Col-0), koja su proizvedena na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu (IBISS). Radi prikupljanja odgovarajuće količine semena visoke klijavosti, gajenje *A. thaliana* obavljeno je u proleće 2021. godine u staklenoj bašti IBISS.



Slika 8. Gajenje biljaka *A. thaliana* u staklenoj bašti radi prikupljanja semena: **A** – Juvenilne biljke u ranoj vegetativnoj fazi, stare 15 dana; **B, C** – Biljke u fazi cvetanja stare oko mesec dana; **D** – Biljke sa silikama u sazrevanju; **E** – Sakupljanje semena u papirnim kesama; **F** – Silike sa zrelim semenima.

Semena su posejana početkom marta direktno u četiri plastične saksije dimenzija $50 \times 14 \times 16$ cm, koje su bile ispunjene komercijalnim supstratom za biljke *Floragard Blumenerde* (Oldenburg, Nemačka). Supstrat se sastojao od visokokvalitetnog baltičkog i severnonemačkog belog i crnog treseta, kompleksnog organskog đubriva, okvašivača *Aqua Plus*, koji je povećavao kapacitet zadržavanja vode, kao i guano đubriva, koje je obezbeđivalo dugotrajno snabdevanje biljaka hranljivim materijama. Prosečna dnevna temperatura u staklenoj bašti iznosila je 27°C, noćna 20°C, a relativna vlažnost vazduha oko 70%. Navodnjavanje je obavljano svakodnevno. Prvi klijanci počeli su da niču sedam dana nakon setve, a njihov broj se značajno povećavao tokom narednih dana. Proređivanje juvenilnih biljaka nije vršeno (**Slika 8A**). Nakon mesec dana gajenja, biljke su započele cvetanje (**Slika 8B, C**), dok su se krajem maja formirale i sazrevale silike sa semenima (**Slika 8D**). U tom periodu, biljke iz jedne saksije podeljene su u više grupa i prekrivene papirnim kesama radi sprečavanja rasipanja semena (**Slika 8E**). Nakon postavljanja papirnih kesa obustavljeno je zalivanje. Kada su se silike u potpunosti osušile (**Slika 8F**), biljke su odsečene iznad korena, a kese sa biljnim materijalom su sakupljene i ostavljene da se dodatno osuše. Zrela i osušena semena su zatim sedam puta prosejavana kroz sito radi uklanjanja nečistoća, nakon čega su upakovana u *Eppendorf*-tubice i *Falcon*-epruvete i čuvana u mraku, na sobnoj temperaturi, do dalje upotrebe.

3.1.2. Priprema hranljivih podloga i laboratorijskog pribora za rad u kulturi *in vitro*

Kao osnovna hranljiva podloga za gajenje juvenilnih biljaka *A. thaliana* u uslovima *in vitro*, korišćena je modifikovana Murashige i Skoog podloga ($\frac{1}{2}$ MS) sa upola razblaženim sadržajem mineralnih soli (Murashige i Skoog, 1962) i vitamina (Linsmaier i Skoog, 1965) (**Tabela 2**). Hemikalije za spravljanje rastvora za hranljive podloge nabavljene su od sledećih proizvođača: *Centrohem d.o.o.* (Stara Pazova), *Lachner* (Neratovice, Češka Republika), *Merck KGaA* (Darmstadt, Nemačka), *Superlab* (Beograd), *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, Misuri, SAD), *T.T.T. d.o.o.* (Novaki, Hrvatska) i *Duchefa Biochemie* (Haarlem, Holandija). U zavisnosti od potreba eksperimenta, $\frac{1}{2}$ MS hranljiva podloga bila je obogaćena 3% (w/v) saharozom i mio-inozitolom (100 mg L⁻¹; *Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Misuri, SAD).

Pre autoklaviranja podešena je pH vrednost hranljive podloge na 5,8 dodavanjem 1 N rastvora NaOH (*Lachner*, Neratovice, Češka Republika). Za potrebe očvršćavanja podloge, korišćen je agar (*Torlak*, Beograd, Srbija) u koncentraciji od 0,8% (w/v), koji je dodavan neposredno pre procesa sterilizacije. Hranljive podloge su sterilisane u autoklavu (*Raypa® AE75*, Barcelona, Španija) na temperaturi od 114°C i pod pritiskom od 80 kPa u trajanju od 25 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja (50°C), $\frac{1}{2}$ MS hranljiva podloga obogaćena je floretinom (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Misuri, SAD) radi postizanja finalnih koncentracija od 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 µM. Matični (stok) rastvor, floretina (1,5 M) napravljen je rastvaranjem čiste supstance u dimetil-sulfoksidu (DMSO; *Duchefa Biochemie*, Haarlem, Holandija). U kontrolnu hranljivu podlogu dodat je DMSO radi postizanja identične koncentracije od 0,1% (v/v) kao u podlogama obogaćenim floretinom. Petri kutije su sadržale po 15 mL hranljive podloge.

Laboratorijsko posuđe, nastavci za pipete i *Eppendorf*-tubice sterilisani su u autoklavu pod istim uslovima kao i hranljive podloge, a zatim su prebačeni u sušnice sa toplim vazduhom, koje su bile opremljene elektronskim termoregulatorom sa digitalnim očitavanjem zadate temperature i

trenutne temperature, kao i digitalnim tajmerom koji omogućava programiranje vremena rada. Sterilne *Eppendorf*-tubice i nastavci za pipete smešteni su u sušnicu *Memmert UN 160* (*Memmert GmbH*, Büchenbach, Nemačka), sa sledećim parametrima: temperatura 60°C, vreme 20 h, ventilacioni otvor 10-20%. Sterilno stakleno posuđe smešteno je u sušnicu *SSN-300* (*Vims elektrik*, Tršić, Srbija) sa konstantnim zadatim parametrima: temperatura 60°C, vreme 8 h, ventilacioni otvor 50%.

Tabela 2. Sadržaj mineralnih soli (Murashige i Skoog, 1962) i vitamina (Linsmaier i Skoog, 1965) u ½MS hranljivoj podlozi.

Makroelementi	Proizvođač	Koncentracija (mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	<i>Centrohem</i>	825
KNO ₃	<i>Centrohem</i>	950
CaCl ₂ × 2H ₂ O	<i>Lachner</i>	220
MgSO ₄ × 7H ₂ O	<i>Merck</i>	185
KH ₂ PO ₄	<i>Lachner</i>	85
Mikroelementi	Proizvođač	Koncentracija (mg L ⁻¹)
MnSO ₄ × 4H ₂ O	<i>Superlab</i>	11,15
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	<i>Lachner</i>	4,30
H ₃ BO ₃	<i>Centrohem</i>	3,10
KJ	<i>Superlab</i>	0,415
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	<i>Merck</i>	0,125
CuSO ₄ × 5H ₂ O	<i>T.T.T. d.o.o.</i>	0,0125
CoCl ₂ × 6H ₂ O	<i>Merck</i>	0,0125
Kompleks gvožđa	Proizvođač	Koncentracija (mg L ⁻¹)
Na ₂ EDTA × 2H ₂ O	<i>Lachner</i>	18,60
FeSO ₄ × 7H ₂ O	<i>Lachner</i>	13,90
Kompleks vitamina	Proizvođač	Koncentracija (mg L ⁻¹)
Vitamin B1	<i>Duchefa</i>	0,05
Vitamin B6	<i>Sigma-Aldrich</i>	0,25
Nikotinska kiselina	<i>Sigma-Aldrich</i>	0,25
Glicin	<i>Sigma-Aldrich</i>	1,00

3.1.3. Sterilizacija semena *A. thaliana* i uslovi gajenja *in vitro*

Rad sa biljnim materijalom vršen je u aseptičnim uslovima u komori sa laminarnim protokom vazduha (laminar *Termovent*, Užice). Instrumenti za rad su sterilisani na visokoj temperaturi upotrebom žarača *SteriMax* (Holandija), koji sadrži keramičku cev koja se može zagrejati do 900°C, čime se omogućava brza i efikasna sterilizacija. Semena *A. thaliana* sterilisana su u komercijalnoj varikini (4-6% NaClO; *Lavex Varikinal*, *Lavazza d.o.o.*, Novi Sad) i 96% etanolu (*Zorka Pharma*, *Hemija d.o.o.*, Šabac, Srbija) primenjenim u odnosu 1:1, tokom 60 s, a nakon toga su ispirana sterilnom dejonizovanom vodom četiri puta. Dejonizovana voda je dobijena preradom vode u sistemu za prečišćavanje sa višestrukim filterima *Milli-Q* (*Merck Millipore*, Frankfurt, Nemačka) i potom

sterilisana u autoklavu *Raypa® AE75* (Barcelona, Španija) na temperaturi od 114°C i pod pritiskom od 80 kPa u trajanju od 25 minuta. Nakon sterilizacije, semena su preneti na prethodno sterilisani filter-papir, a odatle su vrhom sterilnog skalpela pojedinačno prebacivana na čvrste hranljive podloge pod stereo-mikroskopom (*Carl Zeiss*, Jena, Nemačka). Petri kutije sa semenima fiksirane su papirnom trakom kako bi se sprečilo nakupljanje etilena, a zatim izložene procesu hladne stratifikacije u trajanju od tri dana, u frižideru na 4°C, radi sinhronizacije klijanja. Nakon toga, Petri kutije su postavljene u vertikalni položaj na kartonske nosače, na policama u prostoriji za gajenje biljnih kultura sa uslovima dugog dana (16h/8h svetlost/mrak; $35 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i konstantnom temperaturom od $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

U slučaju tečnih hranljivih podloga, *Eppendorf*-tubice sa sterilisanim semenima umotane su u aluminijumsku foliju i držane u frižideru na 4°C radi hladne stratifikacije. Nakon tri dana, semena su pipetom prenošena u erlenmajere sa tečnim hranljivim podlogama, koji su zatim postavljeni na orbitalni šejker (*Kuhner Shaker X*, *Kuhner AG*, Basel, Švajcarska) sa konstantnom brzinom od 95 obrtaja u minuti (eng. *revolutions per minute*, rpm) i prečnikom orbite (eng. *shaking diameter*) standardne veličine od 25 mm, čime je obezbeđeno optimalno snabdevanje juvenilnih biljaka kiseonikom. Erlenmajeri sa juvenilnim biljkama osvetljavani su neonskim svetlima intenziteta $35 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sa fotoperiodom 16h/8h (svetlost/mrak). Temperatura vazduha iznosila je $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2. MORFOMETRIJSKA KARAKTERIZACIJA JUVENILNIH BILJAKA

3.2.1. Analiza uticaja floretina na klijanje i morfološke parametre juvenilnih biljaka

U cilju ispitivanja fitotoksičnih efekata floretina na morfološke parametre juvenilnih biljaka tokom rastenja i razvika, isključavana su semena *A. thaliana* na čvrstim $\frac{1}{2}$ MS hranljivim podlogama sa ili bez dodavanja saharoze i mio-inozitola. Podloge su sadržale floretin u koncentracijama od 0, 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 μM , kao što je opisano u poglavlju 3.1.2. Informacije o morfološkim parametrima juvenilnih biljaka prikupljene su u ranoj vegetativnoj fazi, nakon 5, 10 i 15 dana od početka klijanja. Eksperiment je ponavljen tri puta sa po 10 semena u tri ponavljanja (tri Petri kutije) za svaki tretman, tj. koncentraciju floretina ($n = 90$). Juvenilne biljke su fotografisane u Petri kutijama u svakoj ispitivanoj vremenskoj tački ili pojedinačno pod lupom *Leica Wild M3Z* (*Leica*, Vetzlar, Nemačka) digitalnim fotoaparatom *Nikon Coolpix 4500* (*Nikon*, Tokyo, Japan). U programu *ImageJ 1.53e* (Microsoft Java 1.8.0, *National Institute of Health*, SAD) merene su dužina korena i dužina najdužeg pravog lista svake juvenilne biljke. Dužina korena merena je od hipokotila do vrha primarnog korena, a dužina lista od hipokotila do vrha najdužeg lista. Petnaestog dana od klijanja, dužina juvenilnih biljaka na kontrolnim hranljivim podlogama je bila veća od dijametra Petri kutija u kojima su gajene, te precizno merenje dužine korena u *Image J 1.53e* programu nije bilo moguće. Iz tog razloga, dužina korena je merena ručno uz pomoć pinceta u staklenoj Petri kutiji napunjenoj vodom ispod koje je postavljen lenjir na crnom papiru. Broj listova (bez kotiledona) zabeležen je petnaestog dana tretmana.

Procenti inhibicije (%) dužine korena i dužine izdanka izračunati su prema sledećoj formuli:

$$\text{Procenat inhibicije (\%)} = (1 - L_{fi} / L_k) \times 100 \quad (4)$$

gde je:

L_{fi} = dužina korena ili najdužeg lista juvenilnih biljaka (mm) na i -tom tretmanu floretinom, $i = \{125, 250, \dots, 1500 \mu\text{M}\}$,

L_k = prosečna dužina korena ili lista kontrolnih juvenilnih biljaka (mm).

Broj bočnih i adventivnih korenova određen je pod stereo-mikroskopom (*Carl Zeiss*, Jena, Nemačka).

Procenat inhibicije (%) bočnih korenova izračunat je prema sledećoj formuli:

$$\text{Procenat inhibicije (\%)} = (1 - N_{fi} / N_k) \times 100 \quad (5)$$

gde je:

N_{fi} = broj bočnih korenova na i -tom tretmanu floretinom, pri čemu je $i = \{125, 250, \dots, 1500 \mu\text{M}\}$,

N_k = prosečan broj bočnih korenova na kontrolnim juvenilnim biljkama.

Procent juvenilnih biljaka koje su formirale adventivne korenove (%) izračunat je prema sledećoj formuli:

$$\text{Adv (\%)} = n_{adv} / N \times 100 \quad (6)$$

gde je:

Adv (%) = procenat juvenilnih biljaka sa adventivnim korenovima

n_{adv} = broj juvenilnih biljaka koje su formirale adventivne korenove

N = ukupan broj juvenilnih biljaka po tretmanu

Broj listova u rozeti (bez kotiledona) prebrojan je pod stereo-mikroskopom (*Carl Zeiss*, Jena, Nemačka) nakon 15 dana od klijanja.

Deformacije korena koje su bile posledica narušenog gravitropskog odgovora, opisane su i svrstane u nekoliko kategorija, a zatim je izračunato procentualno učešće određenih kategorija po tretmanima (koncentracijama floretina), za svaku posmatranu vremensku tačku (5, 10 i 15 dana), prema sledećoj formuli:

$$D_k (\%) = (d_k / N) \times 100 \quad (7)$$

gde je:

D_k = procentualno učešće juvenilnih biljaka sa deformacijama određene kategorije;

d_k = broj zabeleženih juvenilnih biljaka sa deformacijama određene kategorije;

N = ukupan broj juvenilnih biljaka po tretmanu.

Izračunavanja gravitropskog indeksa izvršena su za juvenilne biljke starosti 5 i 10 dana. Korišćenjem programa *ImageJ 1.53e*, izmereno je vertikalno pravolinijsko rastojanje od osnove do vrha korena (L_y), kao i stvarna dužina korena (L). Vertikalni gravitropski indeks korena (VGI) izračunat je za svaku juvenilnu biljku pojedinačno kao odnos $L_y : L$, prema metodi Grabov i sar. (2005):

$$\text{VGI} = L_y : L \quad (8)$$

Nakon produženog tretmana u trajanju od 28 dana, zabeležene su morfološke promene na listovima i korenu biljaka, kao i pojava cvetnih stabljika. Biljke su slikane pod lupom *Leica Wild M3Z* digitalnim fotoaparatom *Nikon Coolpix 4500* (*Nikon*, Tokyo, Japan).

U cilju analize uticaja floretina na rastenje i prirast mase juvenilnih biljaka tretiranih isključivo putem korena, semena *A. thaliana* isključavana su u Petri kutijama na čvrstoj $\frac{1}{2}$ MS podlozi bez floretina. Sedmodnevne juvenilne biljke prebačene su u staklene tegle zapremine 250 mL, koje su sadržale po 20 mL čvrste $\frac{1}{2}$ MS podloge obogaćene floretinom do finalnih koncentracija od 0, 250, 500 i 1000 μM . U svaku teglu prebačeno je po pet juvenilnih biljaka pažljivim uranjanjem korena u hranljivu podlogu uz pomoć dugačke pincete, na način da izdanci ne dođu u kontakt sa podlogom. Ovim postupkom obezbeđeno je da juvenilne biljke ostvare kontakt sa floretinom isključivo preko korenovog sistema. Eksperiment je postavljen u četiri biološka ponavljanja (tegla) po tretmanu (koncentraciji floretina) ($n=20$). Nakon 28 dana izvršena je vizuelna procena i fotografisanje biljaka digitalnim fotoaparatom *Nikon Coolpix 4500* (*Nikon*, Tokyo, Japan), a zatim su izmerene mase celih biljaka, kao i pojedinačne mase korena i izdanka korišćenjem analitičke vage *Balance Analytic ABJ 220-4M* (*Kern*, Balingen, Nemačka).

3.2.1.1. Analiza podataka

Podaci dobijeni merenjem morfoloških parametara analizirani su jednofaktorijskom analizom varijanse (ANOVA) u programu *Statistica* (StatSoft Inc., SAD), a razlike između srednjih vrednosti procenjene su Fišerovim *post-hoc* testom najmanje značajne razlike (eng. *Fisher's least significant difference*, LSD) sa nivoom značajnosti $P < 0,05$.

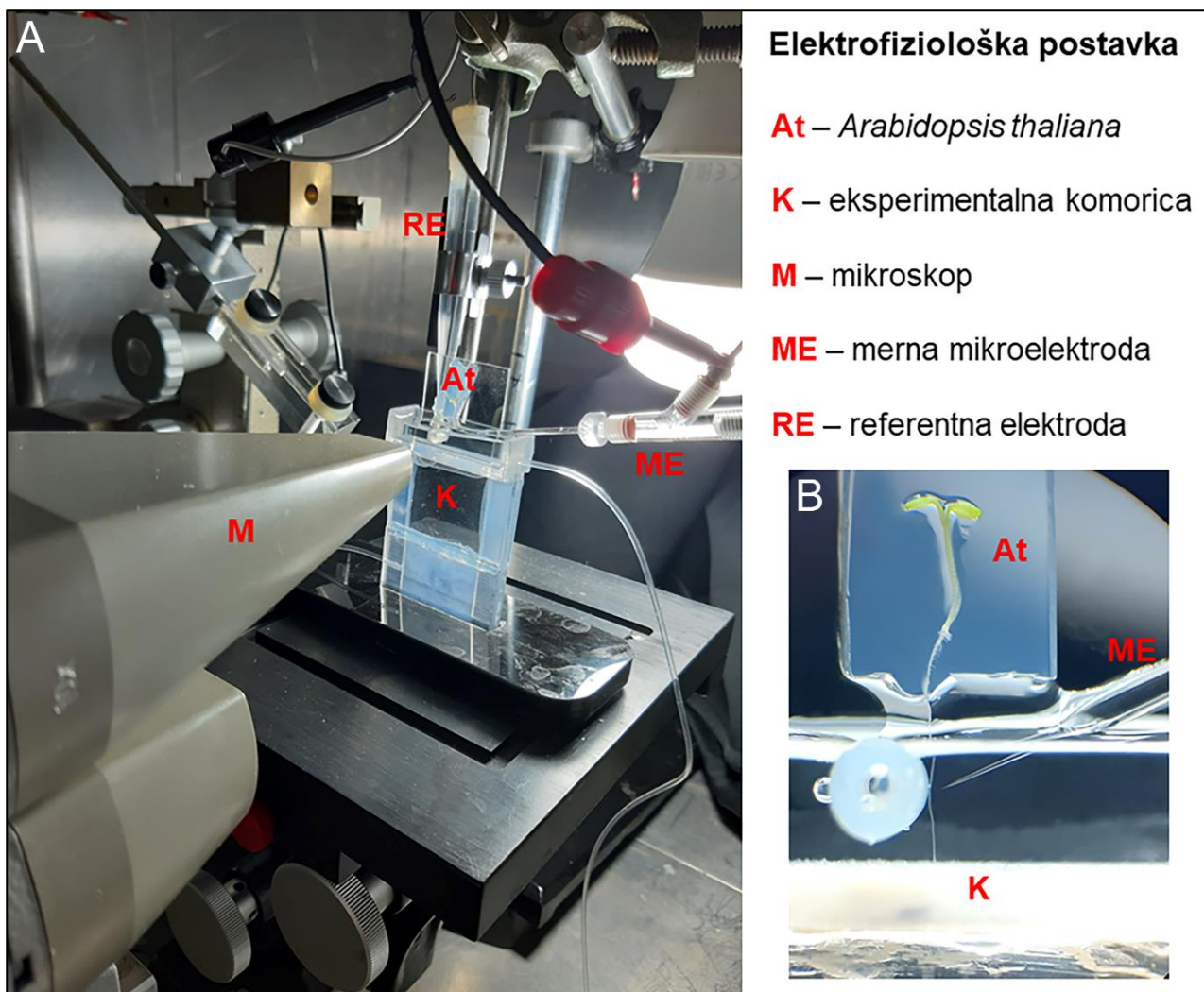
3.3. ELEKTROFIZIOLOŠKA ANALIZA EFEKTA FLORETINA NA EPIDERMALNE ČELIJE KORENA

Radi ispitivanja inicijalnog odgovora korena juvenilnih biljaka *A. thaliana* na floretin, membranski potencijal epidermalnih ćelija korena meren je uz pomoć konvencionalnih intracelularnih mikroelektroda. Biljni materijal obezbeđen je klijanjem semena *A. thaliana* na čvrstoj ½MS hranljivoj podlozi u Petri kutijama postavljenim vertikalno, kao što je prethodno opisano (Poglavlje 3.1.3). Za ovaj eksperiment korišćene su juvenilne biljke stare 5 dana.

3.3.1. Postupak elektrofiziološkog merenja

Za potrebe elektrofizioloških merenja konstruisana je eksperimentalna komorica od pleksiglasa (Institut za nauku i tehnologiju Austrije, Klosterneuburg, Austrija) koja je fiksirana na postolju sa 3-D mehaničkim mikromanipulatorom i smeštena u Faradejev kavez (**Slika 9**), kao što je ranije opisano u radu Friml i sar. (2022). Komorica je napunjena sa 5 mL aerisanog elektrofiziološkog rastvora (eng. *basic salt medium*, BSM; pH 5,5). BSM je pripremljen iz matičnih rastvora: 10 mM CaCl₂ i 10 mM KCl razblaživanjem do konačnih koncentracija od 0,1 mM CaCl₂ i 0,2 mM KCl. Pojedinačne juvenilne biljke prenošene su, zajedno sa čvrstom hranljivom podlogom na kojoj su gajene, na staklenu predmetnu mikroskopsku pločicu. Deo hranjive podloge uz sam koren pažljivo je uklonjen kako bi slobodan deo korena mogao biti direktno uronjen u elektrofiziološki rastvor. Pojedinačne juvenilne biljke dodatno su fiksirane u predelu izdanka uskom trakom od parafilma zajedno sa hranljivom podlogom da bi se izbeglo pomeranje biljke u toku uvođenja mikroelektrode u epidermis korena. Deo mikroskopske pločice sa korenom uronjen je u elektrofiziološki rastvor tako da je nivo tečnosti dosegao do hipokotila juvenilnih biljaka. Položaj korena kontrolisan je preko horizontalnog stereo-mikroskopa (*Leitz*, Wetzlar, Nemačka; uvećanje 160×) uz pomoć mehaničkog 3-D mikromanipulatora (*Leitz*, Wetzlar, Nemačka). Pojedinačne juvenilne biljke inkubirane su u aerisanom elektrofiziološkom rastvoru oko 20 minuta pre početka merenja membranskog potencijala. Aeracija elektrofiziološkog rastvora nije primenjivana tokom merenja membranskog potencijala kako bi se izbeglo narušavanje njegove stabilnosti.

Membranski potencijal korena meren je konvencionalnim srebro/srebrohloridnim (Ag/AgCl) nepolarišućim mikroelektrodama, koje su izrađene izvlačenjem staklenih mikrokapilara sa filamentom (*GB150F*, *Science Products*, Hofheim, Nemačka) na vertikalnom puleru (*700C*, *David Kopf Instruments*, Tujunga, Kalifornija, SAD) i napunjene sa 1 M KCl. Referentna elektroda takođe je bila od Ag/AgCl žice koja je uronjena u plastičnu cevčicu, ispunjenu rasvorom 1 M KCl, i nastavkom od porozne keramike, čime je obezbeđen kontakt sa elektrofiziološkim rastvorom u komorici.



Slika 9. Elektrofiziološka postavka. **A** – Juvenilna biljka *A. thaliana* postavljena je na staklenu predmetnu mikroskopsku pločicu i uronjena u eksperimentalnu komoricu (K) sa elektrofiziološkim rastvorom (eng. *basic salt medium*, BSM). **B** – Juvenilna biljka *A. thaliana* (At) uronjena u eksperimentalnu komoricu (K) pre umetanja merne mikroelektrode (ME).

Merna mikroelektroda fiksirana je na nosač, čija je pozicija bila kontrolisana pod stereo-mikroskopom uz pomoć mehaničkog 3-D mikromanipulatora (**Slika 9**). Elektrode su povezane preko širmovanog kabla sa pojačivačem (*BBA18, OP Amplifier LMC 6081, National Instruments, Austin, Teksas, SAD*) velikog ulaznog otpora ($>10^{15} \Omega$) koji je uz pomoć A/D kartice (*DAQ, LabJack U3-LV, National Instruments, Austin, Teksas, SAD*) i *LabVIEW 7.1* programskog paketa beležio izmerene vrednosti membranskog potencijala u mV na svakih 12 ms. Membranski potencijal meren je tokom 30 - 60 s nakon insercije mikroelektrode, sve dok nije dostignut stacionarni (eng. *steady-state*) nivo.

3.3.2. Ispitivanje efekta floretina na membranski potencijal korena

Nakon uspostavljanja stacionarnog membranskog potencijala, u elektrofiziološki rastvor oko zrele zone korena, u blizini mesta insercije mikroelektrode, pažljivo je dodato 5 μ L rastvora floretina (0,25 M ili 0,5 M) čime je postignuta konačna koncentracija floretina od 250, odnosno 500 μ M. Matični rastvori floretina pripremljeni su korišćenjem 96% (v/v) etanola (*Zorka Pharma*, Hemija d.o.o., Šabac). Kontrolni tretman sadržao je etanol u finalnoj koncentraciji od 0,1% (v/v), što je odgovaralo koncentraciji etanola u tretmanima sa floretinom. Za potrebe elektrofizioloških analiza, etanol je izabran kao optimalan rastvarač za floretin, jer je omogućavao stabilna i konzistentna merenja membranskog potencijala. Za razliku od etanola, DMSO, primenjen u istoj koncentraciji od 0,1% (v/v), dovodio je do pojave nepravilnih i nereproduktivnih signala, te je stoga ocenjen kao nepogodan za upotrebu.

Promena membranskog potencijala praćena je u vremenskom intervalu od 20 do 30 minuta nakon dodavanja floretina (tretman) ili etanola (kontrola) u elektrofiziološki rastvor. Meren je membranski potencijal kod pet juvenilnih biljaka za svaki tretman (kontrola i floretin), sa po jednom insercijom mikroelektrode po biljci.

Za utvrđivanje značajnosti razlika u amplitudama depolarizacije među tretmanima korišćen je Studentov *t*-test (*Statistica* – StatSoft Inc., SAD).

3.4. HISTOLOŠKA ANALIZA KORENA JUVENILNIH BILJAKA

3.4.1. Analiza histološke organizacije primarnog korena

U cilju ispitivanja potencijalnih promena u strukturi korena na tretmanu floretinom, juvenilne biljke *A. thaliana* gajene su vertikalno u Petri kutijama na ½MS hranljivim podlogama (kontrola i 500 μ M floretin). Za potrebe analize histološke organizacije i određivanja dužine zona korena, prikupljene su sveže juvenilne biljke nakon 5 i 10 dana tretmana. Juvenilne biljke su posmatrane i fotografisane pod svetlosnim mikroskopom *Axiovert* (*Carl Zeiss*, Jena, Nemačka) na uvećanju 5 $\times$. Izmerene su dužine korenove kape, meristemske zone i zone izduživanja kod juvenilnih biljaka starih 5 dana u softveru *ImageJ 1.53e*. Uzorci korena sakupljeni su iz dva nezavisna eksperimenta (10 juvenilnih biljaka po tretmanu u svakom eksperimentu). Razlike između srednjih vrednosti dužine korenove kape, meristemske zone i zone izduživanja korena kod kontrole i tretmana procenjene su Studentovim *t*-testom nezavisnih uzoraka u programu *Statistica* (StatSoft Inc., SAD).

3.4.2. Određivanje veličine i distribucije amiloplasta u ćelijama kolumele

Potencijalne razlike u zastupljenosti amiloplasta u vrhovima primarnih korenova kontrolnih i tretiranih biljaka, ispitivane su na juvenilnim biljkama starim 10 dana, gajenim na hranljivim ½MS podlogama (kontrola i 500 μ M floretin) u vertikalno postavljenim Petri kutijama. Za bojenje skrobnih zrna korišćen je Lugolov rastvor (0,37% joda, 0,71% kalijum-jodida, *apoteka Zaječar*). Jedna kap ovog rastvora stavljena je na staklenu mikroskopsku pločicu. Korenovi su postavljeni tako da su

vrhovi bili uronjeni u kap Lugolovog rastvora i inkubirani su najmanje 10 minuta. Za odbojavanje korišćena je gelasta varikina *Kaylon – ultra thick bleach* (*Endeks Kimya*, Istanbul, Turska) (80 g hloral-hidrata, 20 mL glicerola, 20 mL vode) koja trenutno odbojava, a zatim su uzorci isprani u dejonizovanoj vodi u trajanju od dva minuta. Uzorci korena posmatrani su i fotografisani pod svetlosnim mikroskopom *Axiovert* (*Carl Zeiss*, Jena, Nemačka) na uvećanjima 20 i 40×

3.5. ANALIZA ULTRASTRUKTURNIH KARAKTERISTIKA MEZOFILNIH ĆELIJA

U cilju utvrđivanja efekata floretina na ultrastrukturne karakteristike mezofilnih ćelija listova *A. thaliana*, juvenilne biljke su gajene vertikalno na čvrstoj ½MS hranljivoj podlozi (kontrola i 500 μM floretin) u Petri kutijama. Uzorci listova su prikupljeni iz tri nezavisna biološka ponavljanja nakon 10 i 28 dana tretmana.

Sveži listovi su sečeni na fragmente debljine 2 mm, a zatim podvrgnuti standardnoj proceduri pripreme uzoraka za elektronsku mikroskopiju. Fiksacija uzoraka izvršena je 3% (v/v) glutaraldehidom (*Sigma-Aldrich Biochemie*, Hamburg, Nemačka) u natrijum-kakodilatnom puferu (0,1 M, pH 7,2) (*Sigma-Aldrich Biochemie*, Hamburg, Nemačka) na 4°C u trajanju od 4 h. Nakon fiksacije, uzorci su isprani istim puferom u cilju uklanjanja glutaraldehida. Postfiksacija je izvršena 2% rastvorom osmijum-tetroksida (*Sigma-Aldrich Biochemie*, Hamburg, Nemačka) u natrijum-kakodilatnom puferu tokom 2 h na 4°C radi dodatne fiksacije ćelijskih membrana. Nakon toga su uzorci postepeno dehidratirani serijom rastućih koncentracija etil-alkohola. Po završenoj dehidrataciji, izvršeno je kalupljenje uzoraka u smoli Epon-Araldita (*Agar Scientific*, Rotherham, Velika Britanija). Kalupi su sečeni ultramikrotomom *UC6* (*Leica*, Wetzlar, Nemačka) na preseke debljine 1 μm. Dobijeni preseci su postavljeni na predmetna stakla i obojeni katjonskom bojom toluidin plavim (*Fisher Scientific*, Loughborough, Velika Britanija) i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom *Olympus CX41* (*Olympus Europa SE & Co. KG*, Hamburg, Nemačka). Pregledom na svetlosnom mikroskopu odabrani su delovi kalupa koji će biti sečeni za dalje analize. Odabrani preseci debljine 500-700 nm stavljeni su na bakarne mrežice i kontrastirani standardnom procedurom, uranil-acetatom (*Agar Scientific*, Rotherham, Velika Britanija) i olovo-citratom (*Agar Scientific*, Rotherham, Velika Britanija). Snimci preseka listova su dobijeni na elektronskom mikroskopu *Philips/FEI CM12* (*FEI*, Eindhoven, Holandija) na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

3.6.1. Priprema uzoraka i postupak ekstrakcije

Juvenilne biljke *A. thaliana* gajene su u tečnim ½MS hranljivim podlogama (kontrola i 500 µM floretin) kao što je prethodno opisano (Poglavlje 3.1.3). Eksperiment je postavljen u tri biološka ponavljanja za svaki tretman (floretin i kontrolu). Nakon 5, 10 i 28 dana tretmana, sakupljeno je po 50 mg svežih nadzemnih delova juvenilnih biljaka (bez cvetnih drški). Zbog male veličine juvenilnih biljaka nakon 5 dana tretmana, odvajanje nadzemnih delova vršeno je pod stereo-mikroskopom *Carl Zeiss* (Jena, Nemačka). Uzorci (50 mg) su homogenizovani u keramičkim avanima sa tučkom, uz dodavanje tečnog azota (*Messer Tehnogas AD*, Beograd), a zatim ekstrahovani u prisustvu 1 mL 80% (v/v) acetona (*Zorka Pharma, Hemija d.o.o.*, Šabac). Ekstrakti su odlivani u *Eppendorf*-tubice, a zatim centrifugirani u trajanju od 10 minuta na $13\,000 \times g$ (*5430R, Eppendorf*, Hamburg, Nemačka). Supernatanti su prebačeni u nove *Eppendorf*-tubice i čuvani na ledu do spektrofotometrijske analize.

3.6.2. Spektrofotometrijska analiza

Koncentracija fotosintetskih pigmenata određena je spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na merenju apsorbanci ekstrakata na talasnim dužinama od 646,8; 663,2 i 470,0 nm. Optimalni opseg apsorbanci (0,3-0,8) postignut je razblaživanjem ekstrakata 80% (v/v) acetonom (*Zorka Pharma, Hemija d.o.o.*, Šabac, Srbija). Za uzorke prikupljene nakon 10 i 28 dana idealni odnos je bio 2:1 (500 µL ekstrakta i 250 µL acetona), dok uzorci koji su prikupljeni nakon 5 dana tretmana nisu razblaživani. Merenja su izvršena u tri tehnička ponavljanja za svaki uzorak na spektrofotometru *Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer* (Santa Clara, Kalifornija, SAD).

3.6.2.1. Analiza podataka

Koncentracija hlorofila *a* i *b* i karotenoida (karotena i ksantofila) izračunata je korišćenjem sledećih formula (Lichtenthaler, 1987):

$$Ca \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8} \quad (9)$$

$$Cb \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2} \quad (10)$$

$$C(x+c) \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = (1000 A_{470,0} - 1,82 Ca - 85,02 Cb) / 198 \quad (11)$$

$$C(a+b) \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 7,15 A_{663,2} + 18,71 A_{646,8} \quad (12)$$

Pri čemu je:

Ca – sadržaj hlorofila *a*

Cb – sadržaj hlorofila *b*

C(x+c) – sadržaj karotena i ksantofila

C(a+b) – sadržaj ukupnih hlorofila

S obzirom na to da su koncentracije iz formula (6–9) izražene u $\mu\text{g mL}^{-1}$, preračunavanje u $\mu\text{g mg}^{-1}$ sveže mase tkiva izvršeno je na sledeći način:

$$C = (C_x \times V \times R) / m \quad (13)$$

Pri čemu je:

C – koncentracija u $\mu\text{g mg}^{-1}$

C_x – koncentracija u $\mu\text{g mL}^{-1}$

V – zapremina ekstrakta (mL)

R – faktor razblaženja

m – masa uzorka (mg)

Dodatna dva parametra dobijena su na osnovu formula:

$$\text{Odnos hlorofila } a \text{ i } b = Ca / Cb \quad (14)$$

$$\text{Odnos ukupnih hlorofila i karotenoida} = C(a+b) / C(x+c) \quad (15)$$

Razlike između srednjih vrednosti koncentracije fotosintetskih pigmenata kod kontrolnih i juvenilnih biljaka tretiranih floretinom procenjene su Studentovim *t*-testom nezavisnih uzoraka na nivoima značajnosti od $P < 0,05$ i $P < 0,01$, u programu *Statistica* (StatSoft Inc., SAD).

3.7. ANALIZA SADRŽAJA I DISTRIBUCIJE AUKSINA

3.7.1. Kvantitativna analiza auksina i auksinskih metabolita

U cilju ispitivanja efekata floretina na metabolizam indol-3-sirćetne kiseline (eng. *indole-3-acetic acid*, IAA), juvenilne biljke su isključivane iz semena u erlenmajerima sa tečnom hranljivom podlogom i gajena tokom 5 dana, nakon čega su tretirane 500 μM floretinom (tretman) ili 0,1% DMSO (kontrola) u trajanju od 2 i 6 h. Odvajanje korena od izdanka vršeno je pod stereomikroskopom (*Carl Zeiss*, Jena, Nemačka). Svaki uzorak sastojao se od grupisanih izdanaka ili korenova 200 juvenilnih biljaka iz tri nezavisna eksperimenta (približno 10 mg po uzorku). Uzorci su odmah zamrznuti u tečnom azotu (*Messer Tehnogas AD*, Beograd, Srbija) i čuvani u laboratorijskom zamrzivaču na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Nordic Lab ULT U250*, Værløse, Danska). Liofilizacija uzoraka sprovedena je u liofilizatoru *Lyovac GT2/045* (*Leybold*) (Frenkendorf, Švajcarska), a uzorci su zatim čuvani u *Eppendorf*-tubicama upakovanim u vakuum kesice u prisustvu silika gela, na sobnoj temperaturi.

Kvantitativna analiza IAA i njenih metabolita izvršena je u saradnji sa Institutom za eksperimentalnu botaniku (*Institute of Experimental Botany, Czech Academy of Sciences*, Olomouc,

Češka Republika), primenom ultra-efikasne tečne hromatografije sa masenim detektorom (eng. *ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*) (UHPLC–MS/MS) prema metodi koju su opisali Pěnčík i saradnici (2018). Standardi IAA i njenih metabolita: antranilata (eng. *anthranilate*, ANT), indol-3-acetamida (eng. *indole-3-acetamide*, IAM), indol-3-acetonitrila (eng. *indole-3-acetonitrile*, IAN), indol-3-piruvata (eng. *indole-3-pyruvic acid*, IPyA), triptamina (eng. *tryptamine*, TRA) i triptofana (eng. *tryptophan*, TRP) nabavljeni su od proizvođača *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, Misuri, SAD), dok je oksindol-3-sirćetna kiselina (eng. *oxindole-3-acetic acid*, OxIAA) nabavljena od proizvođača *Olchemim Ltd* (Češka Republika). Standardi za IAA-aspartat (eng. *indole-3-acetyl-aspartate*, IAA-Asp) i IAA-glutamat (eng. *indole-3-acetyl glutamate*, IAA-Glu) sintetisani su na osnovu modifikovanih metoda Ilić i sar. (1997), van de Weert i sar. (1998) i Kowalczyk i Sandberg (2001).

Zamrznuti uzorci korenova i izdanaka prebačeni su na led radi sprečavanja enzimske degradacije, a zatim ekstrahovani u 1 mL rashlađenog natrijum-fosfatnog pufera (50 mM, pH 7,0, 4°C) koji je sadržao 0,1% (w/v) natrijum-dietilditiokarbamata. Svakom uzorku dodati su sledeći interni standardi obeleženi stabilnim izotopima: [¹³C₆]IAA, [¹³C₆]ANT, [²H₅]TRA, [¹³C₆]IAM, [¹³C₆]OxIAA, [¹³C₆]IAA-Asp, [¹³C₆]IAA-Glu (2,5 pmol po uzorku), [²H₄]IPyA, [¹³C₆]IAN (5 pmol po uzorku) i [²H₅]TRP (50 pmol po uzorku). Uzorci su homogenizovani upotrebom laboratorijskog mlina *MixerMill MM 301 (Retsch GmbH, Haan, Nemačka)* na frekvenciji od 29 Hz tokom šest minuta uz dodavanje granula stabilizovanog cirkonijum-oksida prečnika 2 mm. Biljni ekstrakti su inkubirani na 4°C uz stalno mešanje tokom 10 minuta, centrifugirani (15 minuta, 23 000 × *g* na 4°C) i prečišćeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi (*in-tip* μSPE; eng. *solid phase extraction*). Prečišćavanje ekstrakata izvršeno je uz pomoć kolona *MultiStage Tip*, koje su pripremljene u skladu sa protokolom Svačinová i sar. (2012). Kolone su sadržale dva tipa ekstrakcionih sorbenta (od svakog po tri sloja): C₁₈ i SDB-XC (Empore™, 3M™).

Iz svakog ekstrakta izdvojena je zapremina od 200 μL, koja je zakiseljena do pH 2,7 dodavanjem 0,1 M HCl (~100 μL) i alikvotirana u kolonu *MultiStage Tip*, koja je bila aktivirana sa 50 μL acetona (centrifugiranjem na 2200 rpm, 10 minuta, 4°C), 50 μL metanola (2200 rpm, 15 minuta, 4°C) i 50 μL vode (2200 rpm, 10 minuta, 4°C). Nakon dodavanja uzorka i centrifugiranja (3400 rpm, 25 minuta, 4°C), kolona je isprana sa 50 μL 0,1% (v/v) sirćetne kiseline (3400 rpm, 15 minuta, 4°C), a zatim eluirana sa 50 μL 80% (v/v) metanola (3400 rpm, 15 minuta, 4°C). Drugi deo od 200 μL ekstrakta derivatizovan je dodavanjem 100 μL 0,75 M cisteamina (pH 8,2) u cilju konvertovanja labilne IPyA u njenu stabilnu tiazolidnu formu IPyA-TAZ (Novák i sar., 2012). Nakon 15-minutne inkubacije, podešen je pH uzoraka na 2,7, a zatim su uzorci prečišćeni kao što je gore navedeno. Oba eluata su spojena u jednu vijalu, vakuumski uparena do čvrstog stanja i skladištena na –20°C do analize LC-MS/MS.

Za potrebe kvantifikacije IAA i njenih metabolita, uzorci u čvrstom stanju rastvoreni su u 40 μL mobilne faze neposredno pre LC –MS/MS analize. Za analizu je upotrebljen sistem *1290 Infinity LC*, koji je bio povezan sa masenim detektorom sa trostrukim kvadrupolom (*6490 Triple Quadrupole LC/MS*) i opremljen sa sistemima *JetStream* i *Dual Ion Funnel* (*Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornija, SAD*). Po 20 μL svakog uzorka injektovano je u reverzno-faznu kolonu (*Kinetex C18 100A*, dužina 50 mm, prečnik 2,1 mm, veličina čestica 1,7 μm; *Phenomenex Inc., Torrance, Kalifornija, SAD*). Analiti su eluirani tokom tri minuta sa metanolnim i vodenim rastvorima sirćetne kiseline (0,1% (v/v)) u odnosima 5:95 do 35:65 u linearnom gradijentu. Nakon toga je kolona isprana

sa 100% (v/v) metanolom tokom jednog minuta i vraćena na početne uslove tokom jednog minuta. Protočna stopa (eng. *flow rate*) tokom analize iznosila je 0,5 mL min⁻¹, a temperatura kolone 40°C.

3.7.1.1. Analiza podataka

Analiti su kvantifikovani korišćenjem dijagnostičkog praćenja višestrukih reakcija (eng. *multiple reaction monitoring*, MRM) prelaza prekursora i odgovarajućih jona proizvoda korišćenjem optimalnih energija sudara i vremena zadržavanja od 50 ms. Hromatogrami su analizirani korišćenjem softvera *MassHunter* (verzija B.05.02; *Agilent Technologies*, Santa Clara, Kalifornija, SAD), a jedinjenja su takođe kvantifikovana standardnom analizom razblaživanja izotopa (Rittenberg i Foster, 1940).

Efekat tretmana, koji se odnosi na povećanje ili smanjenje sadržaja metabolita auksina, izračunat je korišćenjem sledeće formule:

$$\text{Efekat (\%)} = [(A_f / A_k) - 1] \times 100 \quad (16)$$

Pri čemu je:

A_f = sadržaj IAA/metabolita auksina u izdancima ili korenovima juvenilnih biljaka tretiranih 500 μ M floretinom

A_k = sadržaj IAA/metabolita auksina u izdancima ili korenovima kontrolnih juvenilnih biljaka

Izračunati su procenti povećanja (+) ili smanjenja (–) sadržaja metabolita auksina u izdancima i korenovima juvenilnih biljaka. Razlike između vrednosti sadržaja metabolita auksina kod tretiranih i kontrolnih juvenilnih biljaka procenjene su Studentovim *t*-testom nezavisnih uzoraka u programu *Statistica* (StatSoft Inc., SAD).

3.7.2. Analiza distribucije auksina u primarnom korenu juvenilnih biljaka

U cilju vizuelizacije i indirektno kvantifikacije distribucije auksina u vrhovima korena juvenilnih biljaka pod uticajem floretina, korišćena je transgena linija *A. thaliana* DR5rev::GFP. Juvenilne biljke *A. thaliana* DR5rev::GFP i Col-0 isključivane su iz semena i gajene vertikalno na čvrstoj ½MS hranljivoj podlozi u Petri kutijama sa 500 μ M floretina (tretman) ili 0,1% DMSO (kontrola). Po 10 juvenilnih biljaka postavljeno je po Petri kutiji (tretmanu) u tri biološka ponavljanja, u dva nezavisna eksperimenta ($n = 60$). Nakon 5 dana tretmana, korenovi su odvojeni od ostatka juvenilnih biljaka i postavljeni na mikroskopsku pločicu u kapi dejonizovane vode i prekriveni pokrovnim staklom. Nativni preparati korena analizirani su korišćenjem laserskog skenirajućeg konfokalnog sistema *Leica TCS SP5 II* u kombinaciji sa *Leica DMI 6000* invertnim mikroskopom (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Nemačka) opremljenim objektivom *HCX PL APO CS 10.0 x 0.40 DRY UV*. Snimanje fotografija obavljeno je sekvencijalno, na dva kanala. Za ekscitaciju GFP proteina

korišćen je *Argon* laser, koji je emitovao talasnu dužinu od 488 nm, a detektovan je opseg talasnih dužina od 500-530 nm. Drugi kanal je predstavljao transmisiju. Parametri za pojačanje (eng. *gain*) i otvor (eng. *pinhole*) za detekciju GFP proteina bili su konstantni među poređenjima (pojačanje: 1045, ofset (eng. *offset*): -30, otvor: 78,8 µm, 1,49 arbitrarnih jedinica (AJ)). Slike su snimljene sa digitalnim uvećanjem $5,8 \times$ i linijskim presekom (eng. *line average*) od 5. Slike su generisane i izvezeone pomoću softvera *Leica Application Suite Advanced Fluorescence 2.7.3.9723* (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka).

3.7.2.1. Analiza podataka

Ukupna površina GFP fluorescentnog signala i srednji intenzitet fluorescencije kvantifikovani su korišćenjem softvera *ImageJ 1.53e*. Srednji intenzitet fluorescencije meren je kao srednja vrednost sive boje (eng. *mean grey value*) po regionu od interesa (eng. *region of interest*, ROI) korigovana za pozadinski signal. ROI je definisan kao oblast koja je obuhvatala bočne strane korenove kape do apikalnog meristema, isključujući četiri kolone ćelija kolumele u centralnom delu vrha korena. Korenovi juvenilnih biljaka Col-0 nisu pokazivali GFP signal pod istim uslovima snimanja, čime je potvrđena validnost fluorescentnog signala dobijenih kod transgene linije DR5rev::GFP. Razlike između srednjih vrednosti za oba ispitivana parametra (ukupnu površinu GFP fluorescentnog signala i intenzitet fluorescencije) kod tretmana floretinom i kontrole procenjene su Studentovim *t*-testom u programu *Statistica* (StatSoft Inc., SAD).

Efekat tretmana floretinom (povećanje ukupne površine GFP fluorescentnog signala ili srednjeg intenziteta fluorescencije) izračunat je korišćenjem sledeće formule:

$$\text{Efekat (\%)} = [(\text{tretman floretinom} / \text{kontrola}) - 1] \times 100 \quad (17)$$

3.8. ANALIZA ANTIOKSIDATIVNOG STATUSA JUVENILNIH BILJAKA

Nivo oksidativnog stresa kod juvenilnih biljaka tretiranih floretinom procenjen je analizom odabranih neenzimskih i enzimskih komponenti antioksidativnog sistema. Juvenilne biljke su gajene u erlenmajerima sa tečnom $\frac{1}{2}$ MS hranljivom podlogom (kontrola i 500 µM floretin), kao što je prethodno opisano (Poglavlje 3.1.3). Eksperiment je postavljen u tri biološka ponavljanja za svaki tretman (kontrolu i floretin). Nakon 5 i 10 dana tretmana, prikupljen je biljni materijal za dalje analize. Juvenilne biljke su najpre temeljno isprane destilovanom vodom, kako bi se u potpunosti isprali tragovi floretina, a zatim ocedene na filter papiru. Potrebna masa juvenilnih biljaka izmerena je na analitičkoj vagi (*Balance Analytic ABJ 220-4M*, Kern, Nemačka). Uzorci su trenutno zamrzavani u tečnom azotu (*Messer Tehnogas AD*, Beograd, Srbija) i čuvani u zamrzivaču na -80°C (*Nordic Lab ULT U250*, Værløse, Danska) do dalje analize.

3.8.1. Analiza neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema

3.8.1.1. Priprema metanolnih ekstrakata

Za potrebe metanolne ekstrakcije, zamrznut biljni materijal (300 mg) homogenizovan je u tečnom azotu, a ekstrakti su pripremljeni dodavanjem čistog metanola (*Zorka Pharma, Hemija d.o.o., Šabac, Srbija*) u odnosu 1:5 (m:v). Sadržaj je odlivan u *Eppendorf*-tubice zapremine 2 mL i čuvan u frižideru preko noći. Uzorci su narednog dana centrifugirani 10 minuta na $10\,000 \times g$ (centrifuga 5430R, *Eppendorf, Hamburg, Nemačka*), a supernatanti su čuvani u frižideru na $+4^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

3.8.1.2. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata juvenilnih biljaka i metanolnih rastvora floretina

Ukupna antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata juvenilnih biljaka *A. thaliana*, kao i metanolnih rastvora floretina određena je ABTS spektrofotometrijskom metodom (Arnao i sar., 1999) koja je modifikovana za mikrotitar ploče. Kao glavni sastojak reakcione smeše korišćena je diamonijum so 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline (ABTS), koja se u prisustvu vodonik-peroksida oksiduje formirajući ABTS^{++} katjon-radikal, koji reakcionoj smeši daje zelenu boju. Pri kontaktu antioksidanasa iz uzoraka sa ABTS^{++} radikalom dolazi do obezbojavanja reakcione smeše usled redukcije ABTS katjon-radikala u stabilno stanje, što se može detektovati merenjem apsorbance reakcione smeše na 730 nm.

Kao osnovni pufer za analizu korišćen je 50 mM kalijum-fosfatni pufer, koji se sastojao od kalijum-dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) (*Lachner, Neratovice, Češka Republika*) i dikalijum-hidrogen fosfata (K_2HPO_4) (*Avantor, Radnor, Pensilvanija, SAD*), čija je pH vrednost podešena na 7,5 korišćenjem pH-metra (*Edge, Hanna Instruments, Limena, Italija*). Reakciona smeša se sastojala od 2 mM ABTS (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka*), 15 μM vodonik-peroksida (*Centrohem d.o.o., Stara Pazova*) i 0,25 μM peroksidaze rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP; *Sigma-Aldrich, Saint Louis, Misuri, SAD*, 156 U mg^{-1}) rastvorene u kalijum-fosfatnom puferu.

U pojedinačne bunariće na mikrotitar ploči je dodavano po 195 μL rastvora ABTS u kalijum-fosfatnom puferu, 0,31 μL vodonik-peroksida i 4,88 μL HRP. Nakon postizanja stabilne apsorbance na 730 nm usled formiranja ABTS^{++} radikala, dodavano je po 2 μL standarda L-askorbinske kiseline (eng. *ascorbic acid*, AA; *Sigma-Aldrich, Saint Louis, Misuri, SAD*) (0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2 i 4 mM), metanolnih ekstrakata biljnog tkiva, ili metanolnih rastvora floretina u finalnim koncentracijama od 0, 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 μM i zabeleženo je smanjenje apsorbance kao posledica obezbojavanja rastvora tj. smanjenja koncentracije ABTS^{++} radikala. Merenje je obavljeno na spektrofotometarskom čitaču mikrotitar ploča *Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finska)* na 730 nm i 25°C . Razlike u vrednostima apsorbanci pre i posle dodavanja standarda askorbinske kiseline su poslužile za konstrukciju standardne prave i izračunavanje ukupne antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata juvenilnih biljaka i rastvora floretina. Rezultati su izraženi kao mM AA ekvivalenta po gramu sveže mase (mM AA ekv g^{-1} FW) u slučaju juvenilnih biljaka ili μM AA ekvivalenta po mL (μM AA ekv mL^{-1}) u slučaju rastvora floretina.

3.8.1.3. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima juvenilnih biljaka

Analiza sadržaja ukupnih fenola izvršena je po proceduri zasnovanoj na oksidaciji fenolnih jedinjenja u prisustvu *Folin-Ciocalteu* reagensa (Dragišić Maksimović i Živanović, 2012). *Folin-Ciocalteu* reagens sastoji se od smeše fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline, koja ima sposobnost da oksiduje fenolna jedinjenja, prilikom čega se reagens redukuje u smešu volfram-oksida i molibden-oksida, koja dobija plavu obojenost. Intenzitet plave boje je srazmeran sadržaju fenolnih jedinjenja u rastvoru.

Radi konstrukcije standardne prave napravljeni su standardi galne kiseline (eng. *gallic acid*, GA; *Merck KGaA*, Darmstadt, Nemačka) u 100% metanolu, u koncentracijama od 0; 0,1; 0,5; 1; 1,5 i 2 mM. Standardima GA, kao i metanolnim ekstraktima biljnog tkiva, dodat je *Folin-Ciocalteu* reagens (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Misuri, SAD) i nakon inkubacije od tri minuta na sobnoj temperaturi u reakcionu smešu je dodat i 0,2 M natrijum-karbonat (*Merck KGaA*, Darmstadt, Nemačka). Uzorci su potom inkubirani tokom jednog časa u mraku na sobnoj temperaturi do pojave plave obojenosti. Merenje je obavljeno na spektrofotometarskom čitaču mikrotitar ploča *Multiskan Spectrum* (*Thermo Electron Corporation*, Vantaa, Finska) na 724 nm i 25°C, u tri tehnička ponavljanja. Očitane vrednosti absorbanci za standarde GA korišćene su za konstruisanje standardne prave. Sadržaj ukupnih fenola izražen je u mM ekvivalenta GA po gramu sveže mase juvenilnih biljaka (mM GA ekv g⁻¹ FW).

3.8.1.4. Određivanje sadržaja malondialdehida

U cilju određivanja stepena lipidne peroksidacije ćelijskih membrana, sadržaj malondialdehida (MDA) kvantifikovan je prema modifikovanoj metodi Heath i Packer (1968). Uzorci juvenilnih biljaka (100 mg) homogenizovani su u tečnom azotu (*Messer Tehnogas AD*, Beograd) i ekstrahovani sa 1 mL 0,1% (w/v) trihlorosirćetne kiseline (eng. *trichloroacetic acid*, TCA) (*Serva Electrophoresis GmbH*, Heidelberg, Nemačka). Uzorci su centrifugirani na 15 000 × g na 4°C tokom 10 minuta (centrifuga 5430R, *Eppendorf*, Hamburg, Nemačka). Nakon centrifugiranja, po 250 µL supernatanta dodato je u po 500 µL reakcione smeše koja se sastojala od 20% (w/v) TCA i 0,5% (w/v) tiobarbiturinske kiseline (eng. *thiobarbituric acid*, TBA; *Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Misuri, SAD). Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu sa analognim upravljanjem grejanja na 95°C u trajanju od 30 minuta (*Univeba JP Selecta*, *Amex lab*, Wien, Austrija). Uzorci su nakon inkubacije ohlađeni na ledu (*Icematic F125 Compact*, *Castel MAC Srl*, Castelfranco Veneto, Italija), a zatim centrifugirani 15 minuta na 10 000 × g.

Apsorbance supernatanata (100 µL) merene su korišćenjem spektrofotometarskog čitača mikrotitar ploča *Multiskan Spectrum* (*Thermo Electron Corporation*, Vantaa, Finska) na λ₁ = 532 nm i λ₂ = 600 nm, u tri tehnička ponavljanja. Sadržaj MDA u uzorcima izračunat je na sledeći način:

$$\text{MDA (nM g}^{-1}\text{ FW)} = [(A_{532} - A_{600}) / 155] \times 1000 \times (V_e / V_a) \times F \quad (18)$$

Pri čemu je:

A_{532} = apsorbanca na 532 nm;

A_{600} = apsorbanca na 600 nm;

155 = milimolarni koeficijent ekstinkcije (ϵ) MDA na 532 nm ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$);

V_e = zapremina ekstrakta;

V_a = zapremina alikvota;

F = faktor razblaženja uzorka.

3.8.1.5. Određivanje sadržaja prolina

Sadržaj prolina određen je spektrofotometrijskom procedurom koju su opisali Carillo i Gibon (2011). Biljni materijal (50 mg) homogenizovan je u tečnom azotu (*Messer Tehnogas AD*, Beograd) i ekstrahovan sa 1 mL 70% (v/v) etanola (*Zorka Pharma, Hemija d.o.o.*, Šabac, Srbija), tj. u odnosu 20:1 (v/w).

Ninhidrinski reagens pripremljen je rastvaranjem 1% (w/v) ninhidrina (*Thermo ScientificTM*, Voltam, Masačusets, SAD) u 60% (v/v) sirćetnoj kiselini (*Zorka Pharma, Hemija d.o.o.*, Šabac, Srbija), uz zagrevanje na magnetnoj mešalici (*Velp Scientifica*, Usmate Velate, Italija). Standardi prolina pripremljeni su rastvaranjem L-prolina (*Thermo ScientificTM*, Waltham, Masačusets, SAD) u 70% etanolu u koncentracijama od 0; 0,04; 0,1; 0,2; 0,4 i 1 mM. Zapremina od 150 μL ekstrakta svakog uzorka ili standarda L-prolina dodata je u 300 μL ninhidrinskog reagensa, a potom inkubirana u vodenom kupatilu (*Univeba JP Selecta, Amex lab*, Wien, Austrija) na 95°C tokom 20 minuta.

Nakon inkubacije, uzorci su ohlađeni na sobnoj temperaturi tokom 5 minuta a zatim centrifugirani na $2\,500 \times g$ u trajanju od jednog minuta (*centrifuga 5430R, Eppendorf*, Hamburg, Nemačka). Narandžasta boja uzoraka je indikator prisustva prolina, a roze boja ukazuje na prisustvo drugih aminokiselina. Dobijeni supernatanti (100 μL) preneti su na mikrotitar ploču u tri tehnička ponavljanja i merena je apsorbanca korišćenjem spektrofotometarskog čitača mikrotitar ploča *Multiskan Spectrum* (*Thermo Electron Corporation*, Vantaa, Finska) na 520 nm. Sadržaj L-prolina izračunat je korišćenjem jednačine standardne prave i rezultati su izraženi u μM po gramu sveže mase juvenilnih biljaka ($\mu\text{M g}^{-1} \text{FW}$).

3.8.1.6. Određivanje sadržaja vodonik-peroksida

Ukupan sadržaj vodonik-peroksida (H_2O_2) kvantifikovan je prema modifikovanoj metodi Velikova i sar. (2000). Uzorci (100 mg) su homogenizovani u tečnom azotu (*Messer Tehnogas AD*, Beograd, Srbija) i ekstrahovani sa 1 mL 0,1% (w/v) TCA (*Serva Electrophoresis GmbH*, Heidelberg, Nemačka). Nakon centrifugiranja uzoraka u trajanju od 10 minuta na $15\,000 \times g$ na 4°C (*centrifuga 5430R, Eppendorf*, Hamburg, Nemačka), supernatant (200 μL) je pomešan sa 200 μL 10 mM kalijum-fosfatnim puferom (pH 7,0) i 400 μL 1 M KJ. Zapremina od 200 μL svakog uzorka prebačena je na

mikrotitar ploču u tri tehnička ponavljanja i izmerena je apsorbanca korišćenjem spektrofotometarskog čitača mikrotitar ploča *Multiskan Spectrum* (*Thermo Electron Corporation*, Vantaa, Finska) na 390 nm.

Sadržaj H₂O₂ izračunat je na sledeći način:

$$\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{M g}^{-1} \text{FW}) = (A_{390} / 0,28) \times (V_e / V_a) \times F \quad (19)$$

Pri čemu je:

A_{390} = apsorbanca na 390 nm;

0,28 = milimolarni koeficijent ekstinkcije (ϵ) H₂O₂ na 390 nm (mM⁻¹ cm⁻¹);

V_e = zapremina ekstrakta;

V_a = zapremina alikvota;

F = faktor razblaženja uzorka

3.8.2. Analiza enzimskih komponenti antioksidativnog sistema

3.8.2.1. Izolacija ukupnih solubilnih proteina

Smrznuti biljni materijal (500 mg) homogenizovan je u tečnom azotu (*Messer Tehnogas AD*, Beograd, Srbija) u keramičkim avanima, do finog praha, a zatim pomešan sa ekstrakcionim puferom (**Tabela 3**) u odnosu 1:2 (w:v). Sadržaj je prenesen u Eppendorf-tubice i držan na ledu do narednog koraka ekstrakcije.

Tabela 3. Sastav ekstrakcionog pufera za izolaciju solubilnih proteina

Komponente reakcione smeše	Zapremina za 10 mL ekstrakcionog pufera	Finalna koncentracija
1 M TRIS-HCl pH 7,6	5 mL	0,5 M
0,5 M EDTA pH 8,0	2 mL	0,1 M
100% glicerol	1 mL	10%
91,8 mM PMSF	200 μ L	1,8 mM
H ₂ O	do 10 mL	/
PVP nesolubilni	500 mg	5% (w/v)

Ekstrakti su centrifugirani tri puta po 10 minuta na $13\,000 \times g$ pri temperaturi od 4°C (*centrifuga 5430R*, *Eppendorf*, Hamburg, Nemačka) u cilju dobijanja potpuno bistrih supernatanata. Uzorci su skladišteni na -80°C (*Nordic Lab ULT U250*, *Værløse*, Danska) do daljih analiza.

3.8.2.2. Bredfordov esej kvantifikacije proteina

Koncentracija ukupnih solubilnih proteina u uzorcima je utvrđena spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 595 nm (Bradford, 1976) na automatskom čitaču za mikrotitar ploče (*Multiskan FC, Thermo ScientificTM*, Waltham, Masačusets, SAD), korišćenjem albumina iz seruma govečeta (eng. *bovine serum albumin*, BSA) kao proteinskog standarda (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6 i 1,8 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). Reakciona smeša sastojala se od 195 μL komercijalnog Bredford reagensa (boja *Coomassie Brilliant Blue G-250, Cepham Life Sciences*, Fulton, Misuri, SAD) i po 5 μL izolacionog pufera (blank), BSA standarda ili proteinskih izolata u tri tehnička ponavljanja. Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima određena je na osnovu jednačine dobijene iz konstruisane standardne prave i izražena je u $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

3.8.2.3. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima primenom spektrofotometrijskih analiza

3.8.2.3.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza

Ukupna aktivnost superoksid-dismutaza (SOD, *EC 1.15.1.1*) analizirana je prema modifikovanoj metodi Fridovich (1986), koja se zasniva na sposobnosti kompeticije SOD sa fericitohromom *c* (Cyt *c*) za superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$). $\text{O}_2^{\bullet-}$ nastaje aktivnošću enzima ksantin-oksidade u reakciji prevođenja ksantina i kiseonika u uričnu kiselinu. SOD dismutira $\text{O}_2^{\bullet-}$ u vodonik-peroksid i kiseonik, a reakcija koju katalizuje SOD kompetira sa fericitohromom *c* za $\text{O}_2^{\bullet-}$, pri čemu se fericitohrom *c* redukuje u fero-oblik.

Reakciona smeša (1 mL) sastojala se od 50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 7,8) sa 0,1 mM EDTA, 100 μL 0,5 mM ksantina (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Misuri, SAD), 50 μL 6 nM komercijalne ksantin-oksidade iz goveđeg mleka (eng. *xanthine oxidase*, XO, *EC 1.1.3.22*; Klasa I, amonijum-sulfatna suspenzija sa 0,4 U mg^{-1} proteina) i 50 μL 0,2 mM fericitohroma *c* iz konjskog srca (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MW 12 384 Da). Kao kontrola reakcije je korišćen 50 mM kalijum-fosfatni pufer bez EDTA, u cilju dobijanja početne promene apsorbance $\Delta A_{550} = 0,025 \pm 0,005$ u minuti (spektrofotometar 2501 PC, *Shimadzu*, Kyoto, Japan).

Nakon dodavanja proteinskog izolata uzoraka u reakcionu smešu, promena (smanjenje) apsorbance je merena na svakih 10 s u vremenskom intervalu od tri minuta. Jedna jedinica aktivnosti SOD je definisana kao količina enzima potrebna za 50% inhibicije redukcije Cyt *c* na 25°C, u minuti, a izračunata je pomoću sledeće formule (Dragišić Maksimović i Živanović, 2012):

$$\text{Inhibicija (\%)} = ((\Delta A_k - \Delta A) / \Delta A_k) \times 100 \quad (20)$$

gde je:

ΔA_k = promena apsorbance kontrole reakcije na 550 nm u minuti na 25°C

ΔA = promena apsorbance uzorka na 550 nm u minuti na 25°C

Aktivnost SOD po mililitru reakcione smeše ($U\text{ mL}^{-1}$) = Inhibicija (%) / ($50\% \times V_u$) (21)
gde je:

V_u = zapremina uzorka (mL);

50% = inhibicija redukcije fericitohroma c prema definiciji jedinice aktivnosti SOD.

Specifična aktivnost SOD je izražena u jedinicama (U) po miligramu ukupnih solubilnih proteina ($U\text{ mg}^{-1}\text{ prot}$) prema sledećoj jednačini:

$$\text{Aktivnost SOD (U mg}^{-1}\text{ prot)} = \text{aktivnost SOD po mililitru reakcione smeše (U mL}^{-1}\text{)} / \text{koncentracija ukupnih solubilnih proteina u uzorku (mg prot mL}^{-1}\text{)} \quad (22)$$

3.8.2.3.2. *Određivanje aktivnosti katalaza*

Ukupna aktivnost katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) određena je na osnovu modifikovane spektrofotometrijske metode (Aebi, 1983) koja se zasniva na praćenju smanjenja apsorbance na 240 nm usled razgradnje vodonik-peroksida. Reakciona smeša (1 mL) sastojala se od 50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 7,0) koji je sadržao H_2O_2 (Centrohem d.o.o., Stara Pazova) u koncentraciji koja je omogućavala promenu apsorbance od $0,85 \pm 0,02$. Za analize je korišćen UV/Vis spektrofotometar 2501 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Nakon dodavanja 10 μL proteinskog izolata, praćena je kinetika promene (smanjenja) apsorbance na 240 nm usled razgradnje vodonik-peroksida, na svakih 10 s tokom vremenskog intervala od dva minuta. Merenje je izvršeno u tri tehnička ponavljanja za svaki uzorak. Opadanje početne apsorbance tokom vremena ukazivalo je na razgradnju vodonik-peroksida, odnosno na prisustvo aktivne katalaze u uzorku. Dobijena je očekivana promena apsorbance u minuti, koja je bila linearna. Specifična aktivnost katalaze definisana je kao količina enzima potrebna za razgradnju 1 μmol vodonik-peroksida u minuti na 25°C i izračunata korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{Aktivnost CAT po mililitru reakcione smeše (U mL}^{-1}\text{)} = (\Delta A \times V_k) / (0,0436 \times V_u) \quad (23)$$

gde je:

ΔA = smanjenje apsorbance na 240 nm u minuti na 25°C ;

V_k = zapremina reakcione smeše u kiveti (mL);

0,0436 = milimolarni koeficijent ekstinkcije (ϵ) H_2O_2 na 240 nm ($\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$);

V_u = zapremina uzorka (mL).

Specifična enzimska aktivnost CAT izražena je u jedinicama (U) po miligramu ukupnih solubilnih proteina ($U\text{ mg}^{-1}\text{ prot}$) prema sledećoj jednačini:

$$\text{CAT aktivnost (U mg}^{-1} \text{ prot)} = \text{CAT aktivnost po mililitru reakcione smeše (U mL}^{-1}) / \text{koncentracija ukupnih solubilnih proteina u uzorku (mg prot mL}^{-1}) \quad (24)$$

3.8.2.3.3. Određivanje aktivnosti peroksidaza

Ukupna aktivnost peroksidaza (POD, EC 1.11.1.7) određena je spektrofotometrijski prema modifikovanoj metodi Hammerschmidt i sar. (1982). Metoda se zasniva na reakciji formiranja obojenog produkta tetragvajakola iz bezbojnog gvajakola aktivnošću POD iz uzorka u prisustvu vodonik-peroksida. Reakciona smeša (1 mL) sadržala je 2 μL proteinskog izolata uzoraka, 0,25% (v:v) gvajakola (*Carl Roth*, Karlsruhe, Nemačka) i 10 mM vodonik-peroksida (*Centrohem d.o.o.*, Stara Pazova, Srbija) u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu (pH 6,0).

Povećanje apsorbance na 470 nm usled formiranja tetragvajakola mereno je na svakih 10 s tokom vremenskog intervala od tri minuta korišćenjem spektrofotometra 2501 PC (*Shimadzu*, Kyoto, Japan).

Specifična aktivnost POD definisana je kao količina enzima koja oksidiše 1 μmol gvajakola u minuti na 25°C i izračunata je korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{Aktivnost POD po mililitru reakcione smeše (U mL}^{-1}) = (\Delta A \times V_k) / (25,5 \times V_u) \quad (25)$$

gde je:

ΔA = povećanje apsorbance na 470 nm u minuti na 25°C;

V_k = zapremina reakcione smeše u kivetu (mL);

25,5 = koeficijent ekstinkcije (ϵ) tetragvajakola na 470 nm ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

V_u = zapremina uzorka (mL).

Specifična aktivnost POD izražena je u jedinicama (U) po miligramu ukupnih solubilnih proteina (U mg^{-1} proteina) prema sledećoj jednačini:

$$\text{POD aktivnost (U mg}^{-1} \text{ proteina)} = \text{POD aktivnost po mililitru reakcione smeše (U mL}^{-1}) / \text{koncentracija ukupnih solubilnih proteina u uzorku (mg prot mL}^{-1}) \quad (26)$$

3.8.2.3.4. Analiza podataka

Razlike između srednjih vrednosti ispitivanih neenzimskih i enzimskih komponenti antioksidativnog sistema kod kontrolnih i juvenilnih biljaka tretiranih floretinom procenjene su Studentovim *t*-testom, na nivou značajnosti $P < 0,05$. Efekat tretmana floretinom za svaki parametar izračunat je korišćenjem formule (24) i izražen je u procentima:

$$\text{Efekat (\%)} = [(\text{tretman floretinom} / \text{kontrola}) - 1] \times 100 \quad (27)$$

Podaci dobijeni iz ABTS testa za metanolne rastvore floretina obrađeni su korišćenjem jednofaktorijske analize varijanse (ANOVA). Statistički značajne razlike između srednjih vrednosti utvrđene su Fišerovim *post-hoc* testom najmanje značajne razlike (eng. *Fisher's least significant difference*, LSD) na nivou značajnosti $P < 0,05$. Sve analize urađene su u programu *Statistica* (StatSoft Inc., SAD).

3.8.3. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima primenom native gel-elektroforeze

U cilju vizuelizacije enzimске aktivnosti SOD, CAT i POD u proteinskim ekstraktima juvenilnih biljaka *A. thaliana*, kao i razdvajanja njihovih izoformi, korišćena je metoda native elektroforeze u poliakrilamidnom gelu (eng. *Native PAGE*) debljine 1,5 mm, primenom sistema za vertikalnu elektroforezu (*Bio-Rad*, Richmond, SAD) pri naponu od 120 V, u trajanju 1,5 h na temperaturi 4°C.

Tabela 4. Sastav poliakrilamidnih gelova i pufera za nativnu elektroforezu (proizvođač svih hemikalija – *Serva Electrophoresis GmbH*, Heidelberg, Nemačka)

Poliakrilamidni gel za razdvajanje uzoraka	Za 10 mL	
	7 %	10 %
Mešavina 30% akrilamida i 0,8% bisakrilamida	2,35 mL	3,35 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,8 mL	2,8 mL
Voda	4,8 mL	3,8 mL
N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamin (TEMED)	15 µL	15 µL
10% amonijum-persulfat (APS)	30 µL	30 µL
Poliakrilamidni gel za koncentrovanje uzoraka	5 %	
Mešavina 30% akrilamida i 0,8% bisakrilamida	1,66 mL	
1 M Tris, pH 8,0	1,94 mL	
Voda	6,36 mL	
N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamin (TEMED)	15 µL	
10% amonijum-persulfat (APS)	30 µL	
Pufer za elektroforezu	Za 1 L	
25 mM Tris-HCl	3,025 g	
192 mM glicin	14,375 g	
Voda	do 1 L	

Gel se sastojao od dva dela: 5% poliakrilamidni gel za koncentrovanje uzoraka (eng. *stacking gel*) i 7% (za CAT) ili 10% (za SOD i POD) poliakrilamidni gel za razdvajanje uzoraka (eng. *separating gel*) (**Tabela 4**). Pre nanošenja na gelove, uzorci su pomešani sa 5 μ L pufera za uzorke (eng. *sample buffer*), koji je sadržao 124 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,02% (w/v) bromfenol-plavu boju i 20% (v/v) glicerol.

3.8.3.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza

Izoenzimske forme SOD razdvojene su po modifikovanoj metodi Beauchamp i Fridovich (1971). Na gelove je naneto po 20 μ g proteinskog ekstrakta iz tri biološka ponavljanja za svaki tretman. Nakon završene elektroforeze, gelovi su isprani dejonizovanom vodom, a zatim inkubirani u 100 mM kalijum-fosfatnom puferu (pH 7,8) koji je sadržao inhibitore specifičnih izoformi SOD. Kao kontrola korišćen je kalijum-fosfatni pufer, a za inhibiciju su korišćeni 1 mM KCN ili 5 mM H_2O_2 u trajanju od 30 minuta, u mraku. KCN je korišćen za inhibiciju CuZn-SOD, a H_2O_2 za inhibiciju CuZn-SOD i Fe-SOD izoformi. Gelovi su ponovo isprani dejonizovanom vodom, a zatim inkubirani u reagensu za bojenje (**Tabela 5**), u trajanju od 30 minuta u mraku.

Tabela 5. Sastav reagensa za bojenje gelova pri elektroforetskom određivanju aktivnosti superoksid-dismutaza

Hemikalija	Proizvođač	Za 100 mL
Nitro-plavo tetrazolijum (NBT)	<i>Fisher Scientific</i>	22 mg
Riboflavin	<i>Sigma-Aldrich</i>	3 mg
250 mM EDTA	<i>Lachner</i>	400 μ L
N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamin (TEMED)	<i>Serva</i>	20 μ L
100 mM kalijum-fosfatni pufer, pH 7,8	<i>Lachner, Avantor</i>	do 100 mL

Nakon inkubacije, gelovi su isprani dejonizovanom vodom i izloženi sunčevoj svetlosti u cilju formiranja formazana, nerastvornog jedinjenja plavo-ljubičaste boje. Nastanak formazana omogućen je reakcijom nitro-plavo tetrazolijuma (eng. *nitroblue tetrazolium*, NBT) sa $O_2^{\bullet-}$ prisutnim u gelu. Mesta na kojima je bila prisutna SOD bila su vidljiva kao bezbojne trake, usled njene enzimske aktivnosti kojom uklanja $O_2^{\bullet-}$ i time sprečava nastanak formazana. Gelovi su zatim premešteni na plastičnu foliju, na kojoj su fotografisani i skenirani.

3.8.3.2. Određivanje aktivnosti katalaza

Vizuelizacija katalaza izvršena je metodom Woodbury i sar. (1971). Na gelove je naneto po 7 μ g proteinskog ekstrakta iz tri biološka ponavljanja za svaki tretman. Nakon završene elektroforeze, gelovi su isprani dejonizovanom vodom, a zatim inkubirani u 0,01% H_2O_2 tokom 15 minuta na laboratorijskoj klackalici *Mini Rocker MR-1* (*Biosan*, Riga, Letonija). Nakon ponovnog ispiranja dejonizovanom vodom, vršeno je bojenje uz pomoć smeše 2% rastvora $K_3Fe(CN)_6$ i 2% $FeCl_3$, pri čemu je formirano jedinjenje tamnoplavo-zelene boje poznato kao Pruski plavi kompleks $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$. Na mestima aktivne katalaze, uočeno je obezbojavanje gela u vidu traka usled

razgradnje H_2O_2 od strane katalaze. Gelovi su zatim premešteni na plastičnu foliju, na kojoj su fotografisani i skenirani.

3.8.3.3. Određivanje aktivnosti peroksidaza

Razdvajanje i vizuelizacija izoformi peroksidaza vršeni su prema metodi koju je opisao Rothe (2002). Na gelove je naneto po 20 μ g proteinskog ekstrakta iz tri biološka ponavljanja za svaki tretman. Nakon završene elektroforeze, gelovi su isprani u 100 mM citratnom puferu (pH 4,0), a zatim inkubirani u rastvoru za bojenje koji je sadržao citratni pufer, pirogalol i H_2O_2 , do postizanja optimalne obojenosti (**Tabela 6**).

Tabela 6. Rastvor za bojenje gelova

Hemikalija	Proizvođač	Količina za 100 mL rastvora
100 mM citratni pufer pH 4,0	Carl Roth	97,9 mL
Pirogalol (126,1 mg u 2 mL dejonizovane vode)	Sigma-Aldrich	2 mL
30% H_2O_2	Centrohem	114 μ L

Nakon uspešnog bojenja, gelovi su isprani dejonizovanom vodom dva puta i premešteni na plastičnu foliju, na kojoj su fotografisani i skenirani. Izoforme peroksidaza izdvojile su se u vidu crveno-braon traka usled reakcije između H_2O_2 i pirogalola, koja je dovela do nastajanja purpurogalina.

3.9. ANALIZA EFEKTA FLORETINA NA INHIBICIJU ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE I PEROKSIDAZE

Polazeći od prethodno izloženih rezultata koji su ukazali na značajno sniženu aktivnost antioksidativnih enzima u juvenilnim biljkama *A. thaliana* na tretmanu floretinom, javila se potreba za utvrđivanjem postojanja direktnog inhibitornog uticaja floretina na enzime uključene u antioksidativni odgovor, pre svega katalaze i peroksidaze. U tu svrhu sprovedena je *in vitro* kinetička analiza katalitičke aktivnosti odabranih komercijalno dostupnih i visoko prečišćenih enzima, katalaze iz goveđe jetre (eng. *catalase from bovine liver*, CAT) i peroksidaze iz rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) u prisustvu floretina kao potencijalnog inhibitora.

Pored eksperimentalnog pristupa, realizovana je i *in silico* analiza mehanizama enzimske inhibicije korišćenjem molekularne doking analize (eng. *molecular docking*) i simulacije molekulske dinamike koja je dodatno produbila razumevanje interakcija između enzima i floretina, pružajući uvid u moguće vezane položaje, stabilnost kompleksa i strukturne determinante inhibicije.

3.9.1. *In vitro* analiza enzimске inhibicije

In vitro ispitivanje enzimске inhibicije sprovedeno je radi detaljne procene uticaja floretina na aktivnost CAT i HRP u strogo kontrolisanim uslovima. Ovakav pristup omogućio je određivanje kinetičkih parametara i klasifikaciju tipa inhibicije, kao i vizuelizaciju enzimске aktivnosti, što je od ključnog značaja za razumevanje mehanizma interakcije inhibitor–enzim. U nastavku je dat opis korišćenih eksperimentalnih metoda.

3.9.1.1. *Spektrofotometrijski eseji za analizu enzimске aktivnosti*

Spektrofotometrijske analize korišćene su za praćenje promene apsorbance tokom razlaganja/oksidacije supstrata (H_2O_2 ili gvajakola) u reakcijama katalitičke aktivnosti CAT i HRP. Merenja su sprovedena na UV–Vis spektrofotometru *Agilent* 8453 (Santa Clara, Kalifornija, SAD), pri čemu je svako određivanje realizovano u kvarcnim kivetama sa optičkim putem od 1 cm. Reakcione smeše pripremane su neposredno pre merenja, a apsorbanca je kontinuirano praćena na talasnim dužinama karakterističnim za svaki od primenjenih eseja. Radni rastvori CAT i HRP pripremljeni su neposredno pre upotrebe rastvaranjem liofilizovanih enzima u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu do postizanja potrebne koncentracije, uz podešavanje pH na 7,0 za CAT, odnosno 6,0 za HRP.

U slučaju CAT, aktivnost enzima je određena praćenjem smanjenja apsorbance H_2O_2 pri 240 nm, na osnovu modifikovane metode Aebi (1983), kako je detaljno opisano u poglavlju 3.8.2.4.2. Osnovna reakciona smeša (1 mL) se sastojala od 50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 7,0) koji je sadržao 21 μL 3% (v/v) H_2O_2 (finalno 20 mM) kao supstrata. Reakcija je inicirana dodavanjem 10 μL 1 μM rastvora katalaze iz goveđe jetre (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Misuri, SAD, 2000 – 5000 units mg^{-1} proteina) (finalno 10 nM). Promena apsorbance je praćena u realnom vremenu na svakih 10 s, u trajanju od dva minuta.

Aktivnost HRP je određena praćenjem povećanja apsorbance na 470 nm usled formiranja obojenog proizvoda tertragvajakola iz bezbojnog gvajakola u prisustvu H_2O_2 , prema modifikovanoj metodi Hammerschmidt i sar. (1982) opisanoj u poglavlju 3.8.2.4.3. Osnovna reakciona smeša (1 mL) sastojala se od 50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 6,0) sa 20 mM gvajakolom (supstratom) i 10 μL 3% H_2O_2 (finalno 10 mM). Reakcija je inicirana dodavanjem 10 μL 1 μM peroksidaze rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP; *Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Misuri, SAD, 156 U mg^{-1} ; finalno 10 nM). Promena apsorbance je praćena u realnom vremenu na svakih 10 s, u trajanju od tri minuta.

Eksperimenti su izvedeni u optimalnim uslovima za aktivnost enzima (definisani pH i temperatura) kako je opisano u poglavlju 3.8.2.1. Merenja su izvedena u tri tehnička ponavljanja za svaki uzorak. Srednja vrednost apsorbance za svaku vremensku tačku izračunata je iz dobijenih tehničkih ponavljanja i kao takva korišćena za konstrukciju grafika.

3.9.1.2. Izbor rastvarača za pripremu matičnog rastvora floretina

U cilju izbora rastvarača za pripremu matičnog rastvora floretina koji minimalno interferira sa spektrofotometrijskim esejima za CAT i HRP, ispitivan je efekat DMSO, 96% etanola, apsolutnog etanola i metanola. Ispitivani rastvarači dodavani su u odgovarajuće reakcione smeše u zapremini od 100 μ L, dok je zapremina pufera podešavana proporcionalno ukupnoj zapremini od 1 mL. Na osnovu analize kinetičkih krivih koje prikazuju promenu apsorbance u funkciji vremena, apsolutni etanol je identifikovan kao najpovoljniji rastvarač, budući da ispoljava najmanji inhibitorni efekat na aktivnost ispitivanih enzima i minimalno utiče na kvalitet spektrofotometrijskih merenja.

3.9.1.3. Određivanje srednje inhibitorne koncentracije floretina

Srednja inhibitorna vrednost, definisana kao koncentracija inhibitora koja smanjuje enzimsku aktivnost za 50%, određena je merenjem početne brzine reakcije (v) pri fiksnoj koncentraciji supstrata (10 mM H_2O_2 za CAT ili 20 mM gvajakola za HRP) i u prisustvu rastućih koncentracija floretina kao inhibitora.

Matični rastvor floretina (10 mM) pripremljen je rastvaranjem čiste supstance (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Misuri, SAD) u jednakim delovima apsolutnog etanola i 50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 7,0 za CAT i pH 6,0 za HRP spektrofotometrijski esej). Finalne koncentracije inhibitora (0-1000 μ M) dobijene su dodavanjem odgovarajućih zapremina matičnog rastvora floretina, pri čemu je ukupna zapremina reakcione smeše podešena na 1 mL pomoću kalijum-fosfatnog pufera. Radi potpunog neutralisanja efekta etanola na odvijanje katalitičke reakcije, kontrola (reakciona smeša bez floretina) i tretmani floretinom obogaćeni su etanolom do zapremine od 50 μ L, što odgovara zapremini etanola sadržanog u tretmanu najvišom koncentracijom floretina (1000 μ M). Sve pripreme izvršene su neposredno pre izvođenja merenja kako bi se očuvala stabilnost supstrata i inhibitora.

Početna brzina reakcije određena je spektrofotometrijski praćenjem promene apsorbance tokom vremena na odgovarajućoj talasnoj dužini. Na osnovu izmerenih apsorbanci, izračunate su vrednosti za preostalu aktivnost enzima nakon izlaganja inhibitoru (eng. *residual enzyme activity*, REA). Najpre su konstruisani grafici promene apsorbance u toku 1 min za svaku koncentraciju inhibitora, a zatim je na osnovu dobijenih jednačina prave očitana vrednost nagiba (eng. *slope*), koja predstavlja relativnu aktivnost enzima izraženu kao $\Delta A \text{ min}^{-1}$. Vrednost REA izražena je kao odnos relativne enzimske aktivnosti u prisustvu i odsustvu inhibitora, i izračunata na osnovu sledeće formule:

$$\text{REA (\%)} = [\text{Relativna aktivnost enzima u prisustvu inhibitora (slope } i) / \text{Relativna aktivnost enzima u odsustvu inhibitora (slope } k)] \times 100\% \quad (28)$$

gde je:

slope i = nagib prave dobijen u reakciji sa inhibitorom

slope k = nagib prave dobijen u reakciji bez inhibitora (kontrola)

Nakon izračunavanja REA vrednosti, konstruisani su grafici zavisnosti REA od koncentracije inhibitora i izračunate su IC₅₀ vrednosti inhibitora u softveru *GraphPad Prism 8* (Dotmatics, Boston, Masačusets, SAD).

3.9.1.4. Analiza kinetike enzimске inhibicije

Kinetička analiza enzimске aktivnosti CAT i HRP u prisustvu različitih koncentracija inhibitora, tj. floretina, sprovedena je radi određivanja osnovnih kinetičkih parametara koji precizno opisuju promene afiniteta enzima prema supstratu pri delovanju inhibitora, efikasnost katalitičkog procesa, kao i specifičan mehanizam interakcije između inhibitora i slobodnog enzima (E) ili kompleksa enzim–supstrat (ES). Za tu svrhu primenjen je standardni pristup zasnovan na konstrukciji Michaelis–Mentenovog dijagrama, kao i Lineweaver–Burkovog dvostruko recipročnog prikaza.

Koncentracije supstrata (H₂O₂ ili gvajakola) odabrane su tako da obuhvate opseg ispod i iznad očekivane Michaelis–Mentenove konstante (K_m) za CAT i HRP, čime se omogućava precizno određivanje kinetičkih parametara. Finalne koncentracije H₂O₂ iznosile su 5; 7,5; 10; 15; 20; 25 i 30 mM, a koncentracije gvajakola 5; 7,5; 10; 15 i 20 mM.

Za analizu kinetike inhibicije CAT odabrane su finalne koncentracije floretina od 0, 100, 200, 250 i 300 μM. Kinetika inhibicije HRP analizirana je primenom floretina u finalnim koncentracijama od 0, 100, 200 i 400 μM. Sve pripreme izvršene su neposredno pre izvođenja merenja kako bi se očuvala stabilnost supstrata i inhibitora.

Za svaku koncentraciju floretina, konstruisane su prave zavisnosti izmerenih apsorbanci u funkciji vremena, pri različitim koncentracijama supstrata, a početne brzine reakcije određene su iz vrednosti nagiba linearnih dijagrama. Korišćenjem softvera *GraphPad Prism 8*, na osnovu dobijenih vrednosti početnih brzina reakcije, konstruisan je Michaelis–Mentenov dijagram koji predstavlja zavisnost brzine reakcije od koncentracije supstrata za svaku koncentraciju inhibitora (Michaelis i Menten, 1913).

$$v = (V_{\max} \times [S]) / (K_m + [S]) \quad (29)$$

gde je:

v = brzina enzimске reakcije (ΔA min⁻¹)

K_m = Michaelis-Mentenova konstanta

$V_{\max}$ = maksimalna brzina enzimске reakcije u odsustvu inhibitora

$[S]$ = koncentracija supstrata (mM)

Kinetički parametri enzima (K_m , $V_{\max}$, K_i , K_i' , α) određeni su globalnim nelinearnim fitom u programu *GraphPad Prism 8*. Konstante inhibicije K_i i K_i' predstavljaju ravnotežne konstante vezivanja inhibitora za slobodan enzim (E), odnosno za enzim–supstrat (ES) kompleks. Vrednost alfa

(α) predstavlja konstantu modela koja opisuje relativni afinitet inhibitora prema slobodnom enzimu i ES kompleksu i ne zavisi od koncentracije inhibitora. Definisana je kao odnos K_i'/K_i .

U cilju određivanja tipa inhibicije, dobijeni podaci su linearizovani korišćenjem Lineweaver-Burkove jednačine (dvostruki recipročni prikaz) (Lineweaver i Burk, 1934):

$$1/v = K_m/V_{\max} \times 1/[S] + 1/V_{\max} \quad (30)$$

Grafičkom analizom Lineweaver-Burkovih dijagrama za različite koncentracije floretina određen je trend promene kinetičkih parametara K_m i $V_{\max}$, i kinetički model (tip inhibicije) na osnovu promena nagiba i vertikalnog/horizontalnog preseka linearnih dijagrama za različite koncentracije floretina.

U cilju kvalitativne analize mehanizma inhibicije konstruisani su sekundarni plotovi u kojima je nagib (eng. *slope*) ili presek sa Y-osom (eng. *Y intercept*) Lineweaver-Burkove prave za svaku koncentraciju inhibitora prikazan kao funkcija koncentracije inhibitora [I].

$$Slope = (K_m / V_{\max}) \times \alpha_i \quad (31)$$

$$Y \text{ intercept} = (1 / V_{\max}) \times \alpha_i' \quad (32)$$

gde je:

Slope = nagib Lineweaver-Burkove prave

Y intercept = presek sa ordinatom Lineweaver-Burkove prave

K_m = Mihaelis-Mentenova konstanta

$V_{\max}$ = maksimalna brzina enzimske reakcije u odsustvu inhibitora

α_i = faktor koji opisuje uticaj inhibitora na vezivanje supstrata za slobodan enzim

α_i' = faktor koji opisuje uticaj inhibitora na katalitičku aktivnost ES kompleksa

Oblik i linearitet sekundarnih plotova korišćeni su za razlikovanje potpunog od parcijalnog tipa inhibicije, kao i za potvrdu izabranog kinetičkog modela.

3.9.1.5. Vizuelizacija inhibicije enzimske aktivnosti CAT i HRP primenom native gel-elektroforeze

U cilju vizuelizacije enzimske aktivnosti CAT i HRP u prisustvu floretina kao inhibitora, korišćena je metoda native elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (*Native PAGE*) upotrebom eksperimentalnih procedura i aparature opisanih u poglavlju 3.8.2.4.

U pojedinačne bunariće na gelu nanošeno je po 1 ili 2 μ g katalaze (1 μ M) iz goveđe jetre (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Misuri, SAD, 2000 – 5000 units mg^{-1} proteina) ili 10 μ M peroksidaze rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Misuri, SAD, 156 U mg^{-1}). Uzorci su pre nanošenja na gelove pomešani sa po 5 μ L pufera za bojenje koji je sadržao 124 mM

Tris-HCl (pH 6,8), 0,02% (w/v) bromfenol-plavu boju i 20% (v/v) glicerol. Elektroforeza je izvršena pri voltaži od 120 V, u trajanju od 1,5 h i na temperaturi od 4°C.

Nakon elektroforetskog razdvajanja uzoraka, gelovi su temeljno isprani dejonizovanom vodom, a zatim inkubirani u odgovarajućim rastvorima sa dodatkom floretina. Za potrebe ispitivanja inhibicije CAT, korišćen je 0,01% (v/v) rastvor H₂O₂ sa dodatkom floretina u koncentracijama od 0, 50, 250 i 500 µM, dok je za HRP upotrebljen 100 mM citratni pufer (pH 4,0) sa dodatkom floretina u koncentracijama od 0, 500, 1000 i 1500 µM. Matični rastvor floretina (10 mM) pripremljen je na isti način kao i za spektrofotometrijske analize, rastvaranjem čiste supstance u jednakim delovima apsolutnog etanola i 50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 7,0 za CAT ili pH 6,0 za HRP). Kontrolni tretman je sadržao etanol u koncentracijama koje su odgovarale koncentracijama etanola u tretmanima floretinom (2,5 % i 5% za CAT, odnosno HRP esej). Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta, gelovi su isprani dejonizovanom vodom, a zatim obojeni prema prethodno opisanim protokolima i potom dokumentovani. Eksperiment je izveden u tri tehnička ponavljanja.

3.9.2. *In silico* analiza enzimske inhibicije

U cilju razumevanja molekulskih mehanizama koji leže u osnovi inhibitornog efekta floretina na enzimsku aktivnost katalaze i peroksidaze, sprovedena su *in silico* istraživanja koja pružaju uvid u strukturne osnove interakcije floretina sa ovim enzimima. U tu svrhu sprovedene su analize, molekulskog dokinga i simulacije molekulske dinamike, koje su omogućile identifikaciju najpovoljnijih mesta vezivanja, karakterizaciju ključnih interakcija i analizu dinamičkog ponašanja kompleksa enzim–inhibitor. Primenjeni integrativni pristup omogućio je detaljan uvid u molekulske mehanizme inhibicije CAT i HRP floretinom i doprineo je boljem razumevanju odnosa između strukture i funkcije u interakcijama enzim–floretin.

3.9.2.1. *Molekulski doking*

3.9.2.1.1. *Priprema proteina i liganda*

Trodimenzionalne strukture katalaze (PDB ID: 7VD9) i peroksidaze rena (PDB ID: 1HCH) preuzete su iz baze podataka *Protein Data Bank* (www.rcsb.org, 12.05.2024). Proteinske strukture pripremljene su uklanjanjem molekula vode, dodavanjem atoma vodonika i dodeljivanjem odgovarajućih protonacionih stanja na fiziološkom pH (7,4). Struktura floretina je geometrijski optimizovana i dodeljena su joj odgovarajuća parcijalna naelektrisanja za doking proceduru.

3.9.2.1.2. *Blind docking pristup*

Primenjen je potpuno „slepi” (eng. *blind*) doking pristup kako bi se identifikovala najpovoljnija mesta vezivanja floretina na oba enzima bez prethodne pretpostavke ili pristrasnosti

prema određenim regionima vezivanja. Ovaj pristup omogućava objektivno istraživanje cele površine proteina u cilju pronalaženja regiona sa najvećim afinitetom za ligand.

3.9.2.1.3. Softver i parametri za doking

Za simulacije molekulskog dokinga korišćen je softver *YASARA Structure* (verzija 20.12.24.W.64) koji koristi *AutoDock Vina* algoritam, poznat po efikasnosti i tačnosti u predviđanju interakcija između proteina i liganda (Trott i Olson, 2010; Land i Humble, 2018). Prostor pretrage definisan je kao „kutija” (eng. *box*) sa dimenzijama dovoljno velikim da obuhvate celu strukturu proteina, čime je omogućeno istraživanje svih potencijalnih mesta vezivanja. Parametar iscrpnosti (eng. *exhaustiveness*) postavljen je na visoku vrednost (64) kako bi se obezbedilo iscrpno ispitivanje mogućih konformacija vezivanja i povećala verovatnoća pronalaženja optimalne pozicije vezivanja.

3.9.2.1.4. Rangiranje i analiza rezultata

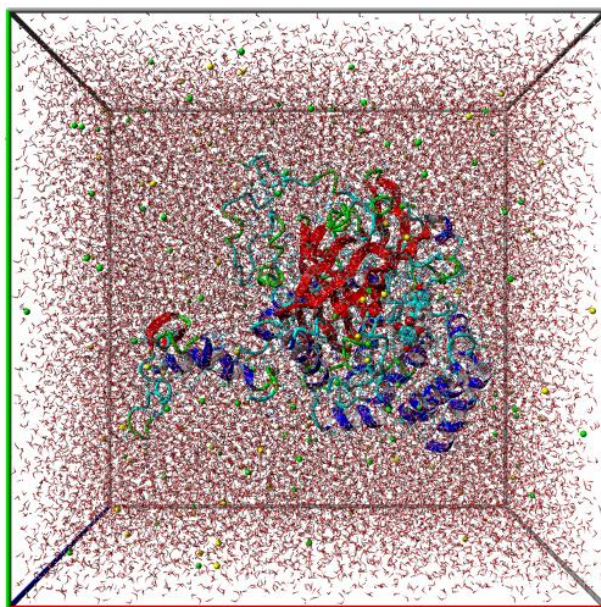
Pozicije vezivanja rangirane su na osnovu vrednosti energije vezivanja izračunate pomoću funkcije skoriranja *AutoDock Vina* algoritma. Ona uzima u obzir različite tipove interakcija uključujući van der Waalove sile, vodonične veze, elektrostatičke interakcije i efekte uklanjanja molekula rastvarača. Nakon rangiranja, izabrane su energetski najpovoljnije pozicije vezivanja za dalju analizu. Analizirane su vodonične i druge nekovalentne interakcije između floretina i enzima radi razumevanja molekularne osnove vezivanja.

3.9.2.2. Simulacije molekulske dinamike

3.9.2.2.1. Priprema sistema

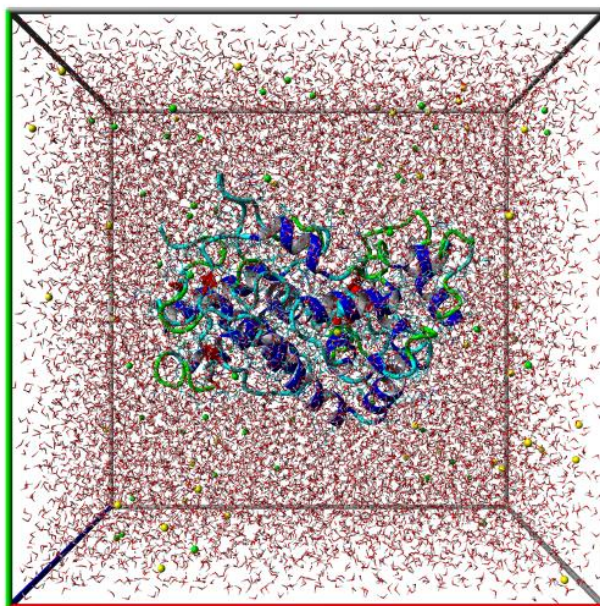
Kompleksi protein–ligand dobijeni iz doking analiza korišćeni su kao početne strukture za simulacije molekulske dinamike. Simulacije su sprovedene pomoću softvera *YASARA* (verzija 20.12.24.W.64) uz primenu *AMBER14* sila polja. Sistemi su pripremljeni na sledeći način:

- **Kompleks katalaza–floretin (Slika 10):** Sistem je sadržao jedan molekul proteina (498 aminokiselinskih ostataka, 7 850 atoma), jedan molekul floretina (34 atoma), 103 Na⁺ jona, 100 Cl⁻ jona i 35 973 molekula vode – ukupno 116 006 atoma.



Slika 10. Kompleks katalaza-floretin

- **Kompleks peroksidaza–floretin (Slika 11):** Sistem je sadržao jedan molekul proteina (306 aminokiselinskih ostataka, 4 695 atoma), jedan molekul floretina (34 atoma), 54 Na^+ jona, 54 Cl^- jona i 19 410 molekula vode – ukupno 63 067 atoma.



Slika 11. Kompleks peroksidaza-floretin

Sistemi su solvatovani korišćenjem TIP3P (eng. *transferable intermolecular potential 3-point*) modela vode, a dodati su i kontra-joni radi neutralizacije sistema i postizanja fiziološke jonske jačine.

3.9.2.2.2. Parametri sila polja

Za sve simulacije je korišćena *AMBER14* sila polja. Parametri za proteine su preuzeti direktno iz *AMBER14* baze, dok su za floretin parametri dodeljeni korišćenjem *YASARA*-inog *AutoSMILES* pristupa, koji uključuje:

- Dodelu pH-zavisnih frakcionih redova vezivanja i obrazaca protonacije
- Identifikaciju poznatih molekula pomoću SMILES zapisa (eng. *simplified molecular input line entry system*)
- Izračunavanje AM1 (eng. *Austin Model 1*) Mullikenovih tačkastih naelektrisanja uz geometrijsku optimizaciju i COSMO model rastvaranja
- Dodelu AM1-BCC tipova atoma i veza
- Korekciju naelektrisanja preko *bond charge correction* (BCC) metode
- Dodatno poboljšanje naelektrisanja korišćenjem RESP (eng. *restrained electrostatic potential*) naelektrisanja sličnih molekulskih fragmenata
- Dodelu GAFF2 (eng. *general AMBER force field 2*) tipova atoma i preostalih parametara

3.9.2.2.3. Protokol simulacije

Simulacije molekulske dinamike su trajale ukupno 250 ns, pri čemu je zabeleženo 1000 snimaka (otprilike jedan na svakih 0,25 ns). Simulacije su sprovedene pod sledećim uslovima:

- Primena periodičnih graničnih uslova da bi se izbegli rubni efekti i simulirali uslovi beskonačnog (eng. *bulk*) sistema
- Održavanje temperature od 310 K (37°C) pomoću algoritma za termičku kontrolu
- Održavanje konstantnog pritiska pomoću algoritma *Manometer* barostata
- Korišćenje višestepenog algoritma sa korakom simulacije od 2,5 fs
- Izračunavanje dugodosežnih elektrostatičkih interakcija korišćenjem *Particle Mesh Ewald* (PME) metode
- Izračunavanje van der Waalsovih interakcija sa presekom od 8 Å

Pre pokretanja glavnih simulacija, sistemi su prvo prošli minimizaciju energije radi uklanjanja steričkih sudara, a zatim ekvibraciju kako bi se omogućila pravilna solvatacija kompleksa i dostizanje ciljne temperature i pritiska.

3.9.2.2.4. Metode analize

Trajektorije dobijene simulacijama analizirane su korišćenjem ugrađenih alata softvera YASARA. Izvršene su sledeće analize:

- **Ukupna potencijalna energija:** Izračunata je prema *AMBER14* sila polja, uključujući doprinose iz energija veza, uglova, dijedara, planarnosti, van der Waalsovih i elektrostatičkih interakcija.
- **Srednje kvadratno odstupanje** (eng. *root mean square deviation*, RMSD): Računato je za glavni lanac (eng. *backbone*) proteina, Ca atome, sve teške atome i atome liganda radi procene stabilnosti strukture i doslednosti pozicije vezivanja.
- **Srednje kvadratno kolebanje** (eng. *root mean square fluctuation*, RMSF): Računato po aminokiselinskom ostatku kako bi se identifikovali fleksibilni regioni proteina i ocenio uticaj vezivanja floretina na lokalnu fleksibilnost.
- **Radijus giracije** (R_g): Računat je radi procene kompaktnosti proteinske strukture tokom simulacije.
- **Analiza vodoničnih veza:** Analizirane su vodonične veze između floretina i enzima radi razumevanja stabilnosti i specifičnosti interakcija.
- **Analiza površine:** Izračunate su van der Waalsove, molekulske i rastvorom pristupačne površine kako bi se procenile potencijalne promene u ekspoziciji molekula floretina prema rastvaraču.

3.10. ANALIZA STABILNOSTI FLORETINA U HRANLJIVIM PODLOGAMA

3.10.1. Prikupljanje i priprema uzoraka

Semena *A. thaliana* su površinski sterilisana i podvrgnuta stratifikaciji, a zatim isključavana u erlenmajerima sa po 20 mL tečne $\frac{1}{2}$ MS hranljive podloge na orbitalnom šejkeru, kako je opisano u poglavlju 3.1.3. Nakon 5 dana, u erlenmajere sa juvenilnim biljkama dodato je po 20 μ L matičnog rastvora floretina (0,5 M) radi postizanja finalne koncentracije od 500 μ M, dok je kontrolnim juvenilnim biljkama dodat DMSO u finalnoj koncentraciji od 0,1% (v/v). Istovremeno su pripremljeni i erlenmajeri sa po 20 mL tečne $\frac{1}{2}$ MS hranljive podloge u koje nisu dodata semena *A. thaliana*, a koji su tretirani na identičan način kao i erlenmajeri sa semenima. Eksperiment je postavljen u tri biološka ponavljanja za svaki tretman (kontrolu i floretin).

3.10.2. Spektrofotometrijska analiza

Stabilnost floretina u tečnim $\frac{1}{2}$ MS podlogama u kojima su gajene biljke *A. thaliana*, kao i u podlogama bez biljaka procenjena je primenom spektrofotometrijske analize. U tu svrhu, prikupljeni su uzorci (1 mL) nakon prvog i desetog dana tretmana floretinom ili DMSO. U sve hranljive podloge je neposredno pre analize dodat čist metanol u odnosu (1:1) u cilju potpunog rastvaranja floretina.

Apsorbance uzoraka određene su na spektrofotometru *Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer* (Santa Clara, Kalifornija, SAD) na talasnoj dužini od 285 nm, koja odgovara literaturnoj vrednosti apsorpcionog maksimuma floretina. Položaj maksimuma apsorpcije potvrđen je snimanjem apsorpcionog spektra rastvora floretina u metanolu ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) (pozitivna kontrola), dok je čist metanol korišćen kao blank. Nakon toga analizirana je kontrolna hranljiva podloga bez dodatog floretina (negativna kontrola) kako bi se potvrdilo odsustvo karakterističnog maksimuma apsorpcije. Ova podloga je nadalje korišćena kao referentni rastvor (blank). Sva merenja su izvedena u tri tehnička ponavljanja. U rezultatima su prikazani reprezentativni dijagrami apsorpcionih spektara ispitivanih hranljivih podloga.

3.11. ANALIZA SADRŽAJA FLORETINA I NJегоVIH DERIVATA U JUVENILNIM BILJKAMA

3.11.1. Gajenje juvenilnih biljaka i priprema metanolnih ekstrakata

Obezbeđen je biljni materijal kao što je navedeno u poglavlju 3.10.1. Približno 250 mg sveže mase juvenilnih biljaka uzorkovano je po jednom biološkom ponavljanju neposredno pre dodavanja floretina, odnosno DMSO (0 h), kao i nakon jednog, tri i deset dana od trenutka dodavanja ovih jedinjenja. Juvenilne biljke su temeljno isprane sterilnom dejonizovanom vodom, dok je višak tečnosti uklonjen filter papirom. Biljni materijal je odmah zamrznut u tečnom azotu (*Messer Tehnogas AD*, Beograd, Srbija) i uskladišten u laboratorijskom zamrzivaču na -80°C (*Nordic Lab ULT U250*, Værløse, Danska) do dalje analize.

Za potrebe metanolne ekstrakcije homogenizovan je zamrznut biljni materijal u tečnom azotu, a ekstrakti su pripremljeni dodavanjem čistog metanola (*Zorka Pharma, Hemija d.o.o.*, Šabac, Srbija) u odnosu 1:5 (w:v) prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.8.1.1.

3.11.2. Kvantifikacija floretina i njegovih derivata primenom HPLC/MS analize

U cilju identifikacije i kvantifikacije floretina i njegovih derivata u metanolnim ekstraktima juvenilnih biljaka *A. thaliana*, primenjena je analiza visokoefikasnom tečnom hromatografijom sa masenim detektorom (eng. *high performance liquid chromatography with mass spectrometry*, HPLC/MS). Prethodno pripremljeni metanolni ekstrakti uzoraka profiltrirani su kroz membranski filter prečnika pora $0,22 \mu\text{m}$, a zatim injektovani u aparat. Vijale sa uzorcima su postavljene u *Waters HPLC* sistem, koji se sastoji od 1525 binarne pumpe, 1510 termostata (eng. *thermostated column compartment*) i 717+ uređaja za automatsko injektiranje (eng. *autosampler*), spregnutog sa masenim detektorom *EMD 1000* sa jednostrukim kvadrupolom (eng. *single quadrupole*) (*Waters*, Milford, Masačusets, SAD). Kao standardi korišćeni su metanolni rastvori floretina i florizina ($1 \text{ mg} : 1 \text{ mL}$) (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Misuri, SAD). Za hromatografsko razdvajanje fenolnih jedinjenja korišćena je reverzno-fazna kolona *Symmetry C-18 RP*, dimenzija $150,0 \times 4,6 \text{ mm}$ sa prečnikom čestica od $5 \mu\text{m}$ (*Waters*, Milford, Masačusets, SAD) povezana sa odgovarajućom pretkolonom (eng.

guard column). Hromatografsko eluiranje izvršeno je brzinom protoka od 1 mL min⁻¹ korišćenjem dve mobilne faze: 0,1% (v/v) mravlja kiselina (komponenta A) i acetonitril (komponenta B) u sledećem koncentracionom gradijentu: 0 min 10% (v/v) B; 0-20 min 10-22% (v/v) B; 20-40 min 22-40% (v/v) B; 40-45 min 40-10% (v/v) B; 45-52,5 min 10% (v/v) B. U sastavu masenog spektrofotometra sa jednostrukim kvadrupolom nalazio se jonski izvor tipa elektrosprej jonizacije (eng. *electrospray ionization*, ESI). Temperatura isparivača je bila 120°C, dok je temperatura na vrhu kapilare bila 380°C, a protok gasa N₂ 500 L h⁻¹. Jonski izvor je bio podešen na sledeće vrednosti: napon na vrhu kapilare jonskog izvora (eng. *capillary voltage*) 3,0 kV, napon na konusu (eng. *cone voltage*) -35 V, vrednost ekstraktora (eng. *extractor*) 3,0 V, napon radio frekventnog (RF) sočiva 0,2 V. Detekcija floretina i njegovih derivata izvršena je u negativnom jonizacionom modu, u opsegu od 100-1000 *m/z*. Floretin i florizin su identifikovani direktnim poređenjem sa spektrima standarda (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Misuri, SAD), koji su odgovarali vrednostima od 273 *m/z* (floretin) i 435 *m/z* (florizin) (*m/z* – masa/naelektrisanje). Ukupna količina floretina i florizina kvantifikovana je metodom eksternog standarda, računanjem površina ispod pikova snimljenih injektiranjem poznatih količina standarda i izražena je u jedinicama µg g⁻¹ FW. Vrednosti koeficijenta determinacije (R²) dobijenih iz kalibracionih krivih iznosile su 0,998930 za florizin i 0,997873 za floretin. Ostala jedinjenja su identifikovana na osnovu poređenja masenih spektara sa literaturnim podacima, bazama podataka i snimljenim spektrima za standarde korišćene u analizama. Usled nedostatka odgovarajućih standarda, sadržaj trilobatina, acil-floretin-diglikozida i floretin-diglikozida je izražen u mikrogramima ekvivalenta florizina po gramu sveže mase (µg Flz g⁻¹ FW). Slično tome, sadržaj floretin-2-O-malonil-heksozida izražen je u mikrogramima ekvivalenta floretina po gramu sveže mase (µg Flt g⁻¹ FW). Obrada podataka i identifikacija pikova na hromatogramu izvršena je u programu *Waters Empower 2* (*Waters*, Milford, Masačusets, SAD).

Strukturne formule floretina i njegovih derivata konstruisane su u programu *Marvin* (*Chemaxon Ltd*, Budapest, Mađarska). Dobijeni podaci su obrađeni korišćenjem jednofaktorijalne analize varijanse (ANOVA). Statistički značajne razlike između srednjih vrednosti utvrđene su Fišerovim *post-hoc* testom najmanje značajne razlike (eng. *Fisher's least significant difference*, LSD) na nivou značajnosti $P < 0,05$. Sve analize urađene su u programu *Statistica* (StatSoft Inc., SAD).

4. REZULTATI

4.1. UTICAJ FLORETINA NA RASTENJE, RAZVIĆE I MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE JUVENILNIH BILJAKA

4.1.1. Analiza uticaja floretina na klijanje i morfološke parametre juvenilnih biljaka u kulturi *in vitro* u prisustvu saharoze i mio-inozitola

Procena fitotoksičnosti floretina kao potencijalnog kandidata za dizajniranje ekološki bezbednog bioherbicida započeta je detaljnim ispitivanjem efekata širokog raspona koncentracija floretina na klijanje, rastenje, razviće i morfološke karakteristike juvenilnih biljaka model-vrste *A. thaliana*, gajenih u stabilnim i kontrolisanim uslovima *in vitro* kulture.

4.1.1.1. Uticaj floretina na klijanje semena

Ispitivanjem klijavosti semena *A. thaliana* na hranljivim podlogama sa rastućim koncentracijama floretina (0 - 1500 μM) utvrđeno je da floretin nema značajan uticaj na klijanje semena ove biljne vrste. Statistička analiza pokazala je da razlike u broju prokljalih semena između tretmana floretinom i kontrolnih uzoraka u istim vremenskim tačkama nisu bile statistički značajne, odnosno da tretman floretinom nije značajno uticao na ukupan procenat prokljalih semena (**Tabela 7**). Izuzetak je zabeležen u tretmanu najnižom koncentracijom floretina (125 μM), u kojem je nakon pet dana tretmana uočen blag porast klijavosti, što ukazuje na prolaznu stimulaciju klijanja. Međutim, u kasnijim vremenskim tačkama procenat klijanja nije se razlikovao u odnosu na kontrolu, niti u odnosu na tretmane sa višim koncentracijama floretina, te se navedeni efekat može smatrati prolaznim i bez uticaja na konačan udeo prokljalih semena.

Tabela 7. Procenat prokljalih semena *A. thaliana* na hranljivim podlogama sa floretinom nakon 5, 10 i 15 dana tretmana. Juvenilne biljke su gajene *in vitro*, u vertikalno postavljenim Petri-kutijama na $\frac{1}{2}$ MS hranljivim podlogama obogaćenim 3% saharozom i 0,01% mio-inozitolom. U tabeli su prikazane srednje vrednosti sa standardnim greškama (eng. *standard error*, SE) za svaki tretman. Ista slova označavaju da razlike u procentima klijanja između tretmana u istim vremenskim tačkama nisu statistički značajne na osnovu Fišerovog testa najmanje značajne razlike ($P < 0,05$). Eksperiment je izveden u tri biološka ponavljanja sa po 30 semena po tretmanu ($n = 90$). $\frac{1}{2}$ MS – modifikovana Murashige i Skoog (1962) hranljiva podloga sa upola razblaženim sadržajem mineralnih soli i vitamina.

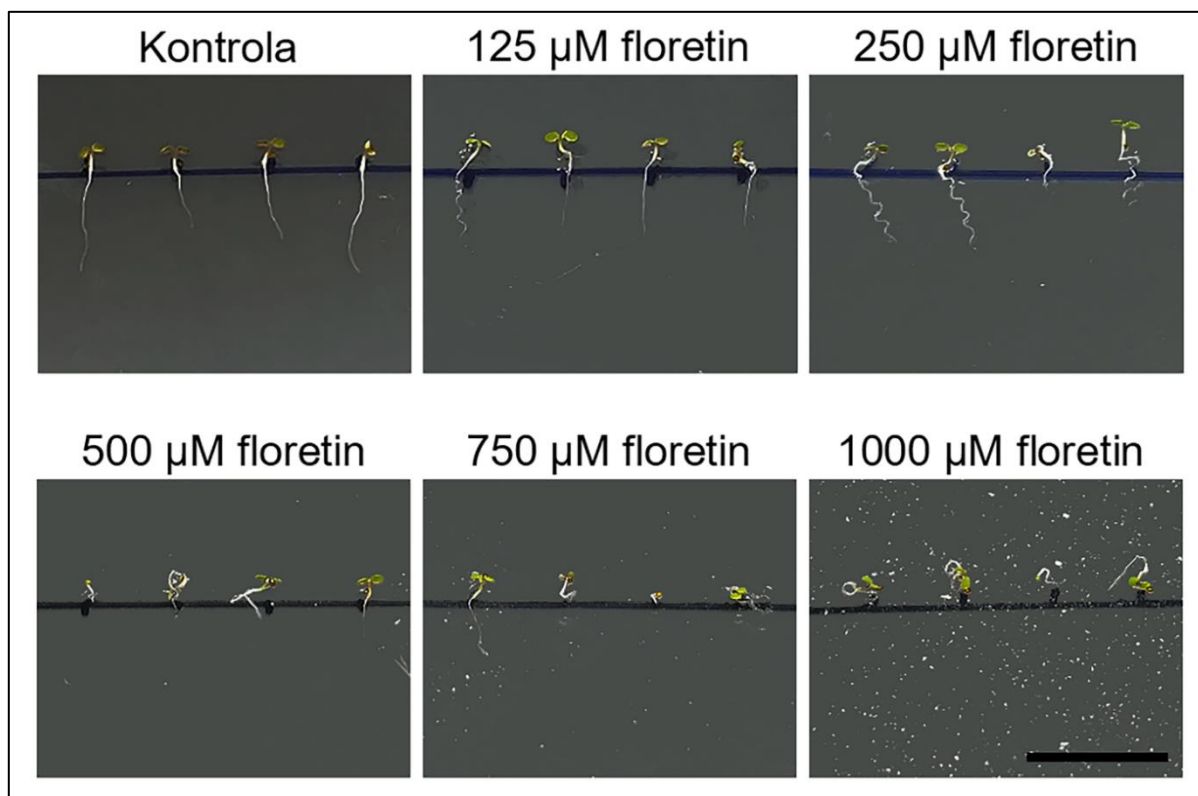
Floretin (μM)	Procenat prokljalih semena (%) $\pm$ SE		
	5 dana	10 dana	15 dana
0	70,0 $\pm$ 4,7 ^{ab}	78,9 $\pm$ 3,5 ^a	82,8 $\pm$ 3,6 ^a
125	77,8 $\pm$ 4,0 ^b	83,3 $\pm$ 3,3 ^a	86,7 $\pm$ 2,1 ^a
250	60,0 $\pm$ 5,5 ^{ab}	72,2 $\pm$ 5,2 ^a	76,7 $\pm$ 5,6 ^a
500	65,6 $\pm$ 5,0 ^{ab}	74,4 $\pm$ 5,3 ^a	75,0 $\pm$ 6,7 ^a
750	62,2 $\pm$ 2,2 ^{ab}	71,1 $\pm$ 3,5 ^a	76,7 $\pm$ 2,1 ^a
1000	63,3 $\pm$ 4,7 ^{ab}	74,4 $\pm$ 4,4 ^a	83,3 $\pm$ 4,9 ^a
1500	70,0 $\pm$ 6,3 ^{ab}	80,0 $\pm$ 5,8 ^a	83,3 $\pm$ 4,2 ^a

U kontrolnim uslovima, kao i u svim tretmanima floretinom, zabeležena je pojava asinhronog klijanja uprkos primeni postupka hladne stratifikacije u cilju prekidanja dormancije i ujednačavanja klijanja. S obzirom na to da je manji broj semena klijao u kasnijim fazama eksperimenta, pri čemu su takve juvenilne biljke pokazivale izraženo kašnjenje u razvoju u odnosu na sinhrono proklijale jedinke, radi obezbeđivanja metodološke uporedivosti i pouzdanosti morfometrijskih analiza, u daljim ispitivanjima obuhvaćene su isključivo sinhrono proklijale juvenilne biljke u ranoj vegetativnoj fazi, odnosno one koje su proklijale u roku od pet dana od početka tretmana.

4.1.1.2. Uticaj floretina na izduživanje primarnog korena

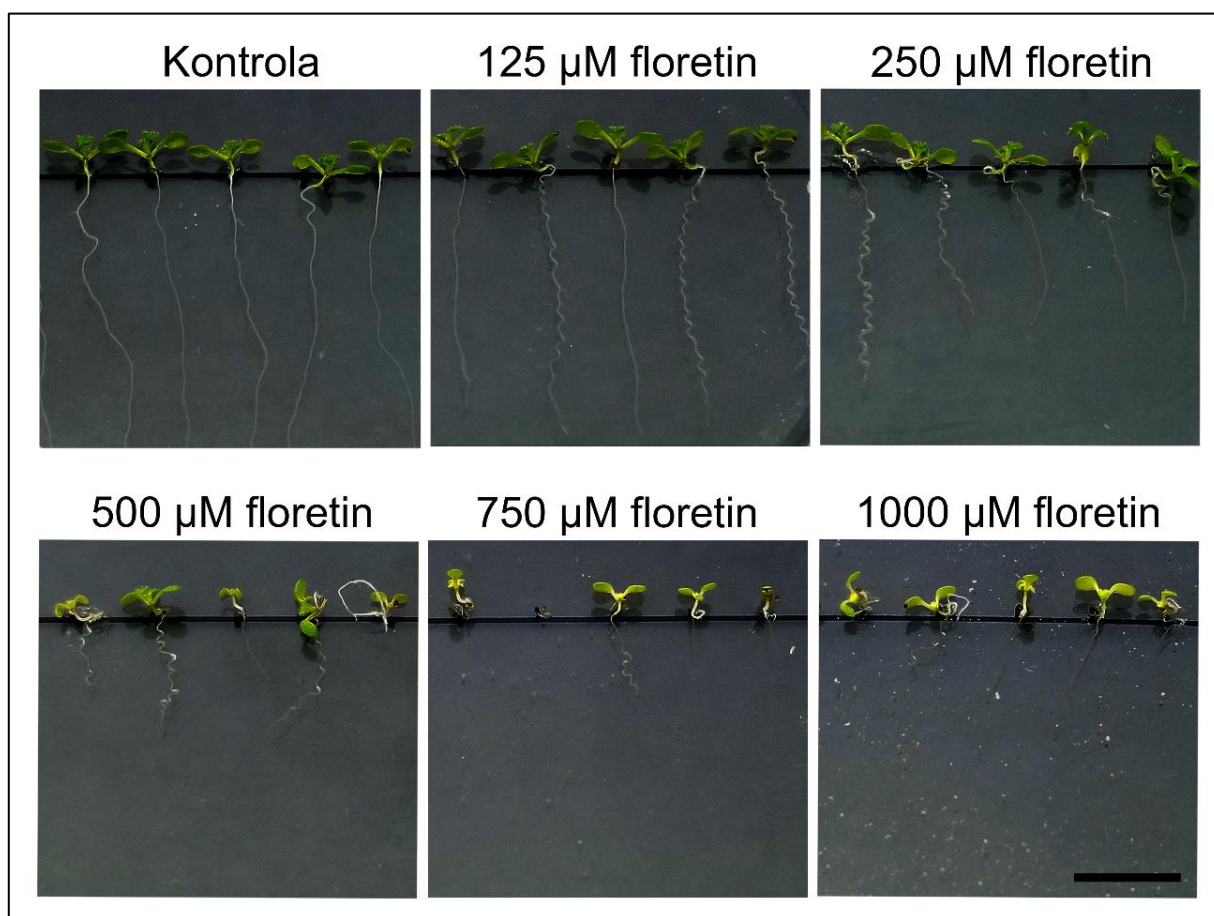
Analiza fitotoksičnog delovanja floretina *in vitro* ukazala je na izraženu osetljivost korenovog sistema juvenilnih biljaka *A. thaliana* na delovanje floretina, kako u pogledu izduživanja primarnog korena, tako i u pogledu promena njegove morfologije i sposobnosti formiranja bočnih i adventivnih korenova.

Vizuelnim pregledom kontrolnih juvenilnih biljaka utvrđeno je da su korenovi bili zdravi, beličaste boje i blago talasastog oblika, sa razgranatošću koja je odgovarala očekivanom izgledu korena za posmatrani razvojni stadijum juvenilnih biljaka (**Slike 12-14**). Kontrolni korenovi su se intenzivno izduživali u uslovima *in vitro* kulture dostižući dužinu od 7,9 mm nakon 5 dana, 43 mm nakon 10 dana, odnosno 60 mm nakon 15 dana tretmana (**Slika 15A**).



Slika 12. Juvenilne biljke *A. thaliana* nakon 5 dana tretmana floretinom (0, 125, 250, 500, 750 i 1000 µM). Juvenilne biljke su gajene vertikalno u Petri-kutijama sa čvrstim ½MS hranljivim podlogama obogaćenim 3% saharozom i 0,01% mio-inozitolom. Bar: 10 mm.

Za razliku od kontrolnih biljaka, kod juvenilnih biljaka gajenih na hranljivim podlogama sa floretinom u koncentracijama od 125 do 1500 μM , primećena je značajna dozno-zavisna inhibicija izduživanja primarnog korena (**Slika 15A**). Tako je, na primer, na koncentraciji floretina od 500 μM , prosečna dužina primarnog korena iznosila 4,9 mm nakon 5 dana, 16,4 mm nakon 10 dana, odnosno 23,6 mm nakon 15 dana tretmana, što približno odgovara trećini dužine korena kontrolnih juvenilnih biljaka iste starosti. Koncentracije floretina iznad 500 μM dodatno su usporavale izduživanje primarnog korena ili su ga potpuno obustavile. Na najvišoj ispitivanoj koncentraciji floretina od 1500 μM , prosečna dužina korena iznosila je 3,5 mm nakon 5 dana, 6,1 mm nakon 10 dana i 8 mm nakon 15 dana tretmana. Inhibicija izduživanja primarnog korena postajala je sve izraženija ne samo sa porastom koncentracije floretina u podlogama, već i sa trajanjem tretmana (**Slika 15B**). Maksimalna inhibicija izduživanja primarnog korena od 86% je postignuta nakon 10 dana tretmana, na koncentraciji floretina od 1500 μM .



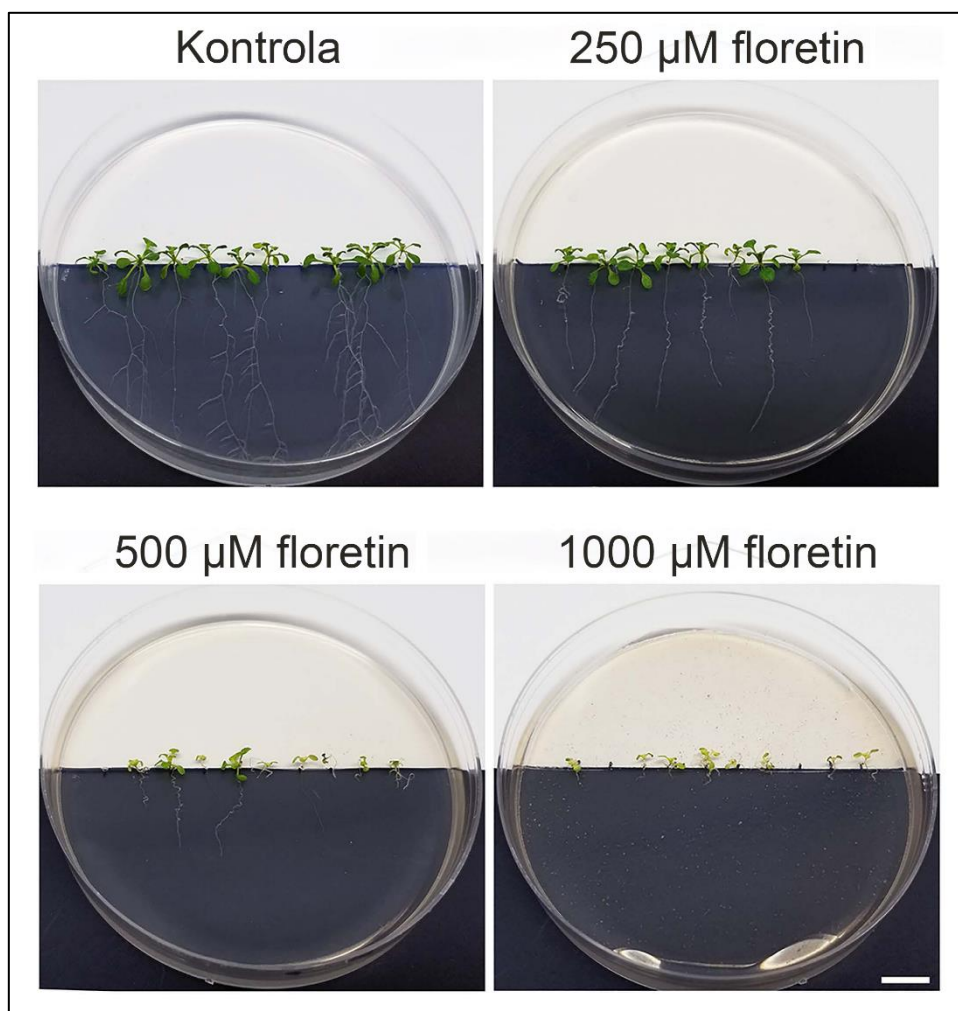
Slika 13. Juvenilne biljke *A. thaliana* nakon 10 dana tretmana floretinom (0, 125, 250, 500, 750 i 1000 μM). Juvenilne biljke su gajene vertikalno u Petri kutijama sa čvrstim $\frac{1}{2}\text{MS}$ hranljivim podlogama obogaćenim 3% saharozom i 0,01% mio-inozitolom. Bar: 10 mm.

Procenat inhibicije od 50% (IC_{50} vrednost) ostvaren je na koncentraciji od približno 400 μM nakon 10 dana tretmana. Na osnovu ove vrednosti, za radnu koncentraciju floretina odabrana je koncentracija od 500 μM , koja je primenjena u daljim histološkim, citološkim, fiziološkim i biohemijskim analizama.

Pored značajne inhibicije izduživanja primarnog korena, nakon 10 dana tretmana na koncentracijama većim od 500 μM , primećena je i promena boje korenova iz bele u svetlo braon.

4.1.1.3. Uticaj floretina na formiranje bočnih korenova

Formiranje bočnih korenova kod juvenilnih biljaka *A. thaliana* je započelo nakon 5 dana od izlaganja semena svetlosti. Kod kontrolnih juvenilnih biljaka, bočni korenovi su se najintenzivnije formirali u periodu od 10 do 15 dana, tako da je nakon 15 dana tretmana formiran u proseku 21 bočni koren po biljci (**Slika 15C**). U ovom vremenskom periodu često je zapažena i pojava sekundarnog grananja bočnih korenova.

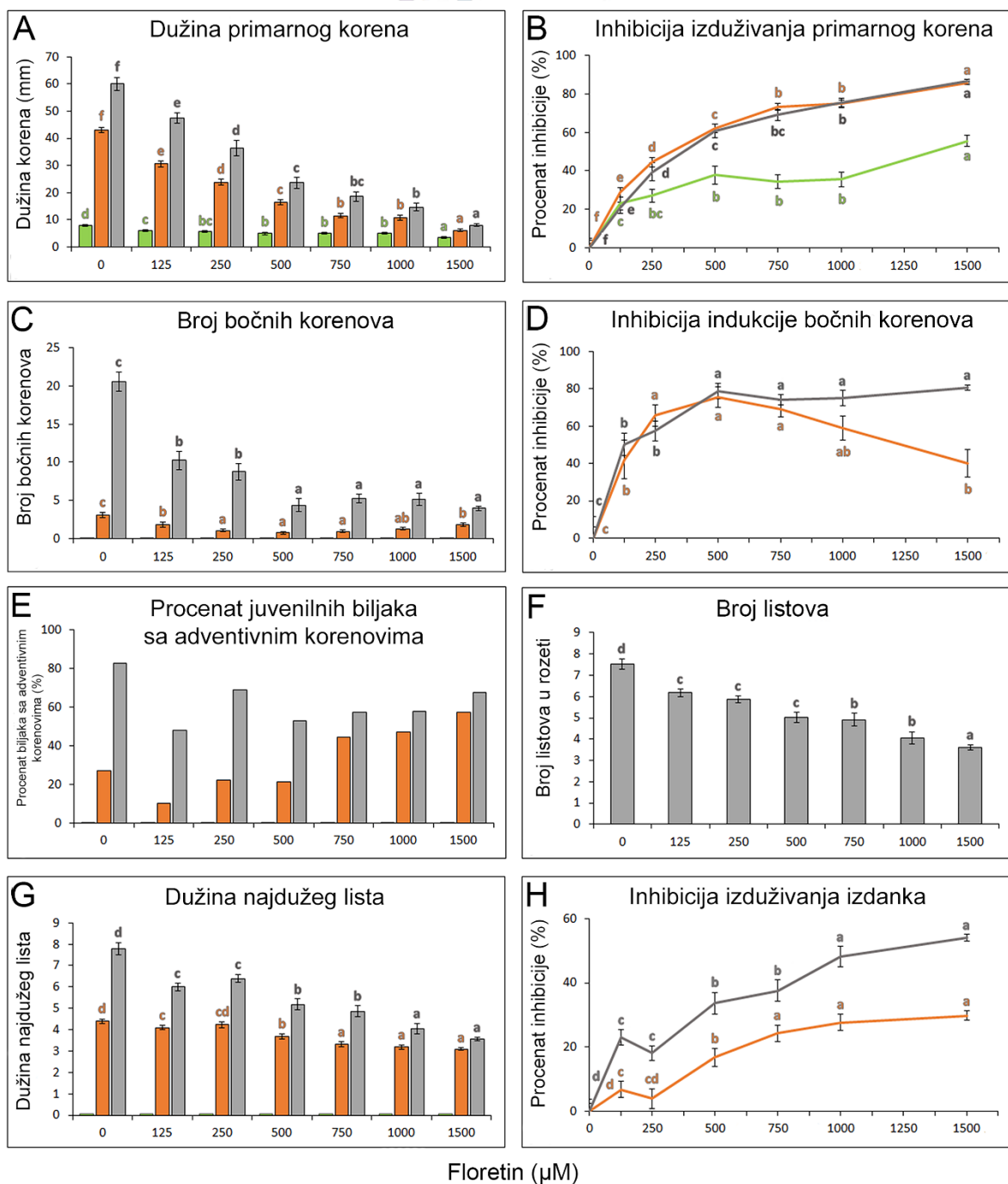


Slika 14. Juvenilne biljke *A. thaliana* nakon 15 dana tretmana floretinom (0, 250, 500 i 1000 μM). Juvenilne biljke su gajene vertikalno u Petri kutijama na čvrstim $\frac{1}{2}$ MS hranljivim podlogama obogaćenim 3% saharozom i 0,01% mio-inozitolom. Bar: 10 mm.

Juvenilne biljke *A. thaliana* gajene na hranljivim podlogama sa floretinom formirale su manji broj bočnih korenova u poređenju sa kontrolnim (**Slika 15C, D**). Nakon 10 dana tretmana, na juvenilnim biljkama nije primećeno više od jednog do dva bočna korena, čak ni pri niskim koncentracijama floretina. U ovoj vremenskoj tački, srednji opseg koncentracija floretina je imao najizraženiji negativni efekat na formiranje bočnih korenova. Petnaestog dana, juvenilne biljke na tretmanima sa nižim koncentracijama floretina formirale su u proseku između osam i deset bočnih korenova, dok su na srednjim i visokim koncentracijama formirale od četiri do pet bočna korena, tj. približno pet puta manji broj bočnih korenova u odnosu na kontrolu. Očigledno, nepovoljni efekat visokih koncentracija bio je znatno izraženiji pri dužem trajanju tretmana (15 dana).

Morfometrijske karakteristike juvenilnih biljaka *A. thaliana*

■ 5 ■ 10 ■ 15 dana



Slika 15. Uticaj floretina na morfometrijske karakteristike juvenilnih biljaka *A. thaliana* gajenih na hranljivim podlogama sa saharozom i mio-inozitolom. Juvenilne biljke su gajene vertikalno u Petri kutijama na ½MS čvrstim hranljivim podlogama sa floretinom (0-1500 µM), sa 3% saharozom i 0,01% mio-inozitolom. Vrednosti morfoloških parametara zabeležene su 5, 10. i 15. dana tretmana. **A** – Dužina primarnog korena; **B** – Dozno-zavisne krive inhibicije izduživanja primarnog korena; **C** – Prosečan broj bočnih korenova; **D** – Dozno-zavisne krive inhibicije broja bočnih korenova; **E** – Procenat juvenilnih biljaka koje su formirale adventivne korenove; **F** – Prosečan broj listova; **G** – Dužina najdužeg lista; **H** – Dozno-zavisne krive inhibicije izduživanja izdanka. Histogrami predstavljaju srednje vrednosti sa standardnim greškama (SE), a slova na graficima predstavljaju rezultat Fišerovog testa najmanje značajne razlike ($P < 0,05$). Ista slova označavaju da razlike u srednjim vrednostima tretmana nisu statistički značajne. Eksperiment je izveden u tri biološka ponavljanja sa po 30 semena po tretmanu ($n=90$).

4.1.1.4. Uticaj floretina na formiranje adventivnih korenova

Adventivni korenovi su bili jasno uočljivi na hipokotilu juvenilnih biljaka, neposredno iznad baze primarnog korena i morfološki su se razlikovali od bočnih korenova. Iako je najveći broj adventivnih korenova razvijen u periodu od 10. do 15. dana tretmana, njihova pojava je bila prilično neujednačena čak i na kontrolnim tretmanima. Neke kontrolne juvenilne biljke nisu uopšte razvijale adventivne korenove, dok su druge imale najčešće jedan, a ponekad i nekoliko adventivnih korenova. Zbog navedenih variranja, kao najpouzdaniji parametar procene uticaja floretina na njihov razvoj, umesto prosečnog broja adventivnih korenova po biljci, korišćen je procenat biljaka koje su formirale adventivne korenove na svakoj od koncentracija floretina. Tako je kod kontrolnih juvenilnih biljaka, 27% biljaka razvilo adventivne korenove nakon 10 dana, odnosno 82% biljaka nakon 15 dana tretmana (**Slika 15E**).

Procenat juvenilnih biljaka sa adventivnim korenovima nakon 10 dana tretmana niskim koncentracijama floretina bio je nešto niži nego kod kontrole i kretao se od 10% do 22%. Nasuprot tome, tretman visokim koncentracijama ispoljio je stimulatивно delovanje, te je znatno veći procenat juvenilnih biljaka razvio adventivne korenove (44 - 60%) (**Slika 15E**). Nakon 15 dana tretmana, procenat juvenilnih biljaka sa adventivnim korenovima na tretmanima floretinom bio je znatno niži nego na kontrolnom tretmanu. Na nižim koncentracijama floretina zabeleženo je između 48% i 69% takvih juvenilnih biljaka, dok je na visokim koncentracijama taj broj iznosio od 58% do 68% (**Slika 15E**). Za razliku od primarnog korena, boja adventivnih korenova je bila bela čak i na visokim koncentracijama floretina.

Rezultati ukazuju da niske koncentracije floretina blago inhibiraju formiranje adventivnih korenova, dok visoke koncentracije u početnoj fazi tretmana deluju stimulatивно. Međutim, nakon dužeg izlaganja, razlike između tretmana i kontrole se smanjuju, što sugeriše da efekat jedinjenja zavisi i od koncentracije, i od trajanja tretmana.

4.1.1.5. Uticaj floretina na rastenje i razviće izdanaka

Analize fitotoksičnog delovanja floretina ukazuju na značajnu osetljivost izdanaka juvenilnih biljaka *A. thaliana* na prisustvo ovog jedinjenja, pri čemu je delovanje, kao i u slučaju korena, bilo izraženije na višim koncentracijama floretina.

Nakon 5 dana tretmana, izdanak kontrolnih juvenilnih biljaka činila su samo dva kotiledona, dok su pravi listovi bili u stadijumu pupoljka. Prosečna dužina kotiledona iznosila je oko 1,5 mm i nije se značajno razlikovala između kontrole i tretmana. U periodu od 5. do 10. dana, kontrolne juvenilne biljke počele su da razvijaju prave listove koji su u narednom periodu obrazovali lisnu rozetu. Petnaestog dana, lisnu rozetu sačinjavalo je od 7 do 8 krupnih, zelenih listova (**Slika 15F**) prosečne dužine 7,8 mm (**Slika 15G**).

Juvenilne biljke gajene na hranljivim podlogama obogaćenim floretinom su imale znatno sitnije rozete sa manjim brojem listova u poređenju sa kontrolnim tretmanom. Broj pravih listova u rozeti bio je značajno smanjen već na tretmanima nižim koncentracijama floretina (**Slike 15F**). Na srednjim koncentracijama floretina, juvenilne biljke su razvijale u proseku po 5 listova u rozeti, dok

su na tretmanima sa visokim koncentracijama imale između tri i četiri lista, što je približno dva puta manji broj nego kod kontrolnih biljaka. Takođe, na izdancima su zapaženi znakovi hloroze, posebno na tretmanima sa visokim koncentracijama floretina (**Slike 13 i 14**).

Tretmani nižim koncentracijama floretina indukovali su blagu inhibiciju izduživanja izdanka, dok su srednje i visoke koncentracije imale izraženiji efekat (**Slika 15G**). Za razliku od dužine primarnog korena, kod koga je maksimalna inhibicija od 86% postignuta nakon 10, odnosno 15 dana tretmana 1500 μM floretinom, inhibicija izdanaka bila je znatno manje izražena i iznosila je 30% nakon 10 dana, odnosno 54% nakon 15 dana tretmana najvišom koncentracijom floretina (**Slika 15H**). Procenat inhibicije izduživanja izdanka od 50% (IC_{50} vrednost) nakon 15 dana tretmana odgovarao je koncentraciji floretina od 1125 μM , što ukazuje na znatno slabiji inhibitorni uticaj floretina na izdanak u poređenju sa korenom juvenilnih biljaka.

4.1.2. Analiza uticaja floretina na morfološke parametre juvenilnih biljaka u kulturi *in vitro* u odsustvu saharoze i mio-inozitola

U cilju boljeg razumevanja delovanja floretina, a s obzirom na to da se ugljeni hidrati u zemljištu nalaze u minimalnim količinama i ne služe biljkama kao primarni izvor energije, sprovedena je analiza morfometrijskih parametara juvenilnih biljaka gajenih na hranljivim podlogama bez saharoze i mio-inozitola (BSIM). Cilj ovih istraživanja je bio da se eliminiše efekat koji suplementacija ugljenim hidratima može imati na preživljavanje juvenilnih biljaka na tretmanu floretinom u standardnim *in vitro* uslovima.

4.1.2.1. Uticaj floretina na izduživanje i morfološke karakteristike primarnog korena

Analizom morfometrijskih parametara utvrđeno je da je rastenje i razviće svih juvenilnih biljaka (kontrolnih i tretiranih floretinom) gajenih u odsustvu saharoze i mio-inozitola bilo znatno sporije u odnosu na biljke gajene na klasičnim podlogama koje su sadržale ove nutrijente (SIM). Fitotoksično delovanje floretina na biljke gajene na BSIM podlogama se odrazilo pre svega kroz inhibiciju rastenja i izduživanja primarnog korena (**Slika 16A, B**). Dužina primarnog korena nakon 5 dana se veoma malo razlikovala među tretmanima različitim koncentracijama floretina, ali je bila značajno niža u poređenju sa dužinom kontrolnih korenova (**Slika 16A**). Nakon 10 dana, prosečna dužina korena na tretmanu najnižom primenjenom koncentracijom floretina od 125 μM bila je duplo manja u poređenju sa kontrolom, dok je na tretmanu najvišom koncentracijom floretina od 1500 μM bila skoro 5 puta manja. Nakon 15 dana, razlike u prosečnoj dužini korena bile su još izraženije. Tako je na tretmanu sa 125 μM floretinom prosečna dužina primarnog korena bila više nego duplo smanjena u odnosu na kontrolu, dok je tretman koncentracijom od 1500 μM doveo do skoro sedmostrukog smanjenja dužine primarnog korena (**Slika 16A**).

Iako odsustvo saharoze i mio-inozitola u hranljivim podlogama nije uticalo na povećanje maksimalnog intenziteta inhibicije floretinom postignutog na 1500 μM , imalo je značajan uticaj na povećanje procenta inhibicije izduživanja primarnog korena na svim ostalim koncentracijama

floretina, u svim ispitivanim vremenskim tačkama (**Slika 16B**) u poređenju sa podlogama sa saharozom i mio-inozitolom (**Slika 15B**). IC₅₀ vrednost dostignuta je već na koncentraciji od 125 μ M nakon 10 i 15 dana, dok je ta vrednost bila znatno viša na klasičnim podlogama: 400 μ M nakon 10 i 375 μ M nakon 15 dana. Takođe, plato maksimalnog delovanja u svim posmatranim vremenskim tačkama formiran je počevši od 500 μ M koncentracije, za razliku od tretmana u prisustvu saharoze i mio-inozitola, gde je bio primetan stalan porast inhibicije sa povećanjem doze sve do postizanja maksimalnih vrednosti za datu vremensku tačku.

4.1.2.2. Uticaj floretina na formiranje bočnih korenova

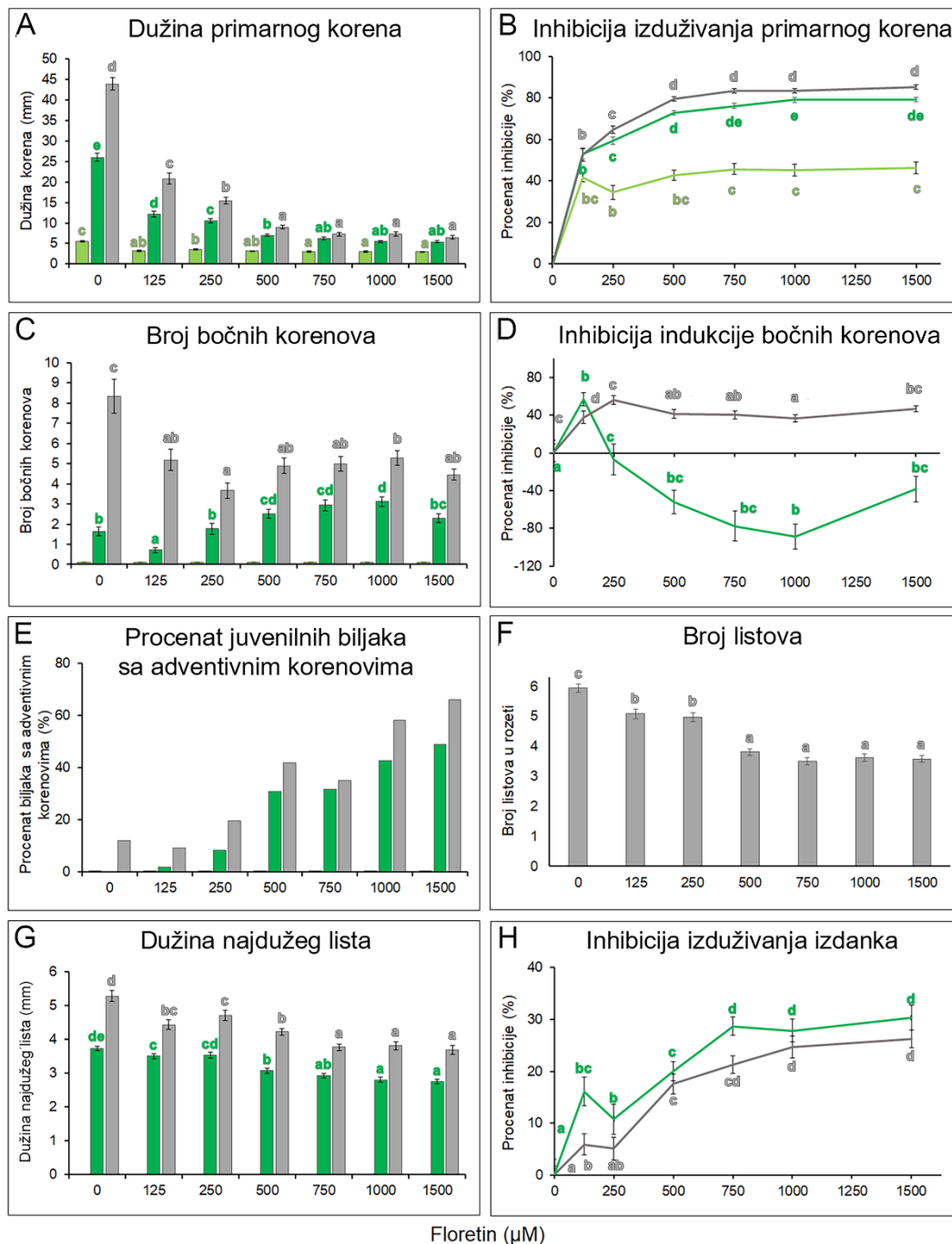
Primordije bočnih korenova na BSIM podlogama počele su da se razvijaju u slično vreme kao i kod SIM podloga tj. između 5. i 10. dana od izlaganja svetlosti. Međutim, prosečan broj bočnih korenova kod kontrolnih juvenilnih biljaka zabeležen desetog dana (8,3) bio je oko 2,5 puta manji nego na standardnim SIM podlogama (20,6). Neočekivano, nakon 10 dana tretmana, zapažena je značajna stimulacija razvoja bočnih korenova na svim koncentracijama floretina iznad 250 μ M (**Slika 16C**). Međutim, u narednih 5 dana, nove primordije su se manje intenzivno razvijale na tretmanima floretinom nego na kontroli, tako da je nakon 15 dana prosečan broj bočnih korenova na svim tretmanima floretinom bio manji nego kod kontrole u proseku za 40% (**Slika 16D**). Očigledno je da je tretman floretinom izazvao prolaznu stimulaciju razvoja bočnih korenova, najverovatnije kao način prevazilaženja inhibicije rastanja primarnog korena. Maksimalna inhibicija razvoja bočnih korenova od 56% postignuta je na koncentraciji od 250 μ M nakon 15 dana tretmana, dok su srednje i visoke koncentracije bile manje inhibitorne. Možemo zaključiti da je odsustvo saharoze i mio-inozitola u podlogama ublažilo negativan efekat floretina na formiranje bočnih korenova.

4.1.2.3. Uticaj floretina na formiranje adventivnih korenova

Odsustvo saharoze i mio-inozitola znatno je usporilo razvoj adventivnih korenova, tako da su se oni kod kontrolnih juvenilnih biljaka razvijali tek između 10. i 15. dana od izlaganja svetlosti. Na svakom od tretmana, zabeležen je manji procenat juvenilnih biljaka sa adventivnim korenovima u odnosu na SIM podlogu u istim vremenskim tačkama. Međutim, u BSIM uslovima, zapaženo je znatno stimulatивно delovanje floretina koje je bivalo sve intenzivnije sa porastom njegove koncentracije (**Slika 16E**). Tako je na podlozi sa 125 μ M floretinom samo 1,7% juvenilnih biljaka razvilo adventivne korenove nakon 10 dana tretmana, dok se na floretinu u koncentraciji od 1500 μ M učestalost njihovog formiranja povećala na 49%. Nakon 15 dana, samo 12% kontrolnih juvenilnih biljaka razvilo je adventivne korenove, dok je takvih juvenilnih biljaka na tretmanu najvišom koncentracijom floretina (1500 μ M) bilo čak 66%. U poređenju sa tretmanom na SIM podlogama, postignuta je pravilnija distribucija adventivnih korenova, koja je bila dozno-zavisna.

Morfometrijske karakteristike juvenilnih biljaka *A. thaliana* gajenih na hranljivim podlogama bez saharoze i mio-inozitola

■ 5 ■ 10 ■ 15 dana



Slika 16. Uticaj floretina na morfometrijske karakteristike juvenilnih biljaka *A. thaliana* gajenih na hranljivim podlogama bez saharoze i mio-inozitola. Juvenilne biljke su gajene vertikalno u Petri kutijama na ½MS čvrstim hranljivim podlogama sa floretinom (0-1500 µM). Vrednosti morfoloških parametara zabeležene su nakon 5, 10. i 15. dana tretmana. **A** – Dužina primarnog korena; **B** – Dozno-zavisne krive inhibicije izduživanja primarnog korena; **C** – Prosečan broj bočnih korenova; **D** – Dozno-zavisne krive inhibicije broja bočnih korenova; **E** – Procentat juvenilnih biljaka sa formiranim adventivnim korenovima; **F** – Prosečan broj listova; **G** – Dužina najdužeg lista; **H** – Dozno-zavisne krive inhibicije izduživanja izdanka. Histogrami predstavljaju srednje vrednosti sa standardnim greškama (SE), a slova na graficima predstavljaju rezultat Fišerovog testa najmanje značajne razlike ($P < 0,05$). Ista slova označavaju da razlike u srednjim vrednostima tretmana nisu statistički značajne. Eksperiment je izveden u tri biološka ponavljanja sa po 30 semena po tretmanu ($n=90$).

4.1.2.4. Uticaj floretina na rastenje i razviće izdanaka

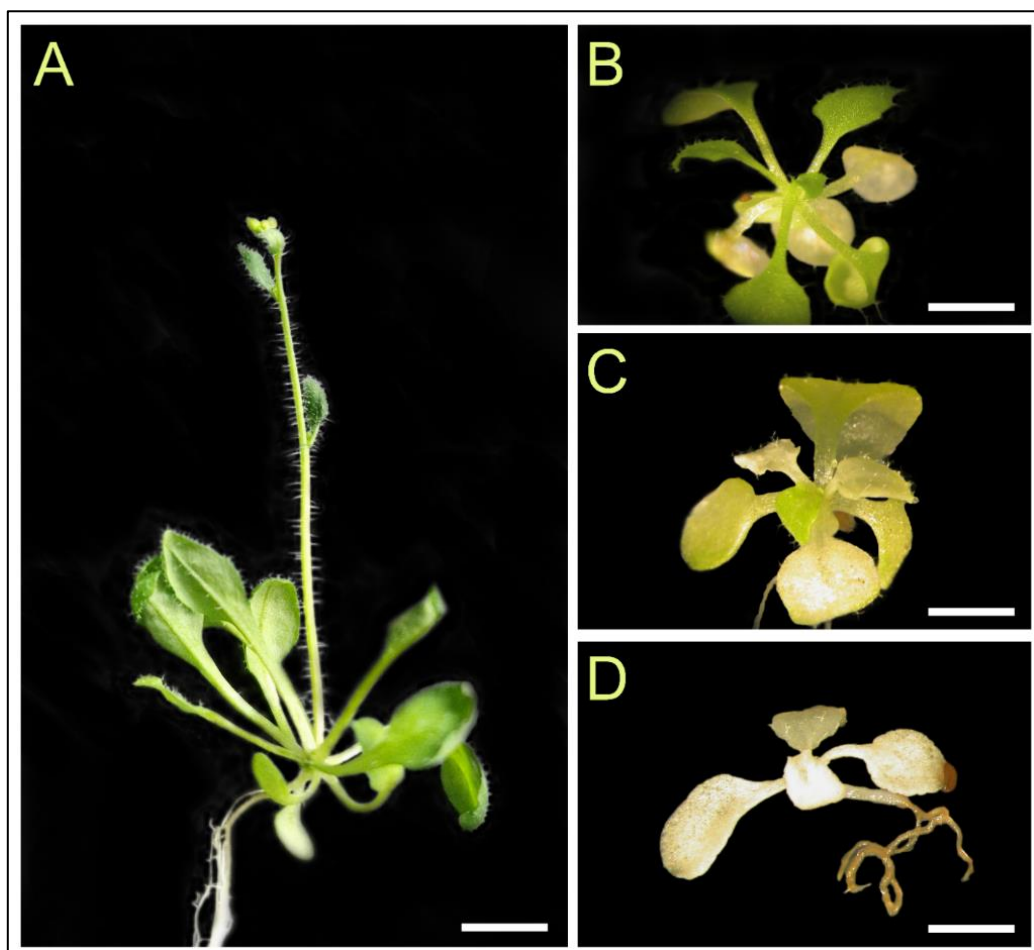
U skladu sa sporijim razvojem korenovog sistema na BSIM podlogama u odnosu na one sa saharozom i mio-inozitolom, zapažen je i nešto sporiji razvoj izdanka. Na ovim podlogama, kao i na SIM, floretin je imao značajan uticaj na broj i dužinu listova u rozeti. Nakon 15 dana tretmana, kontrolne juvenilne biljke razvile su u proseku po šest listova u rozeti, dok je kod tretiranih juvenilnih biljaka broj listova bio značajno manji. Na tretmanima srednjim i visokim koncentracijama floretina zabeleženo je samo tri do četiri lista po rozeti (**Slika 16F**). Primećena je i blaga hloroza listova tretiranih juvenilnih biljaka na srednjim i višim koncentracijama nakon 15 dana tretmana.

Dužina listova juvenilnih biljaka, koji su gajeni na hranljivim podlogama sa floretinom, bila je značajno manja u odnosu na dužinu listova kontrolnih juvenilnih biljaka. Prosečna dužina listova kod kontrolnih juvenilnih biljaka iznosila je 3,7 mm, a na najvišoj ispitivanoj koncentraciji floretina (1500 μM) 2,7 mm (**Slika 16G**). U periodu od narednih 5 dana, dužina lista kod juvenilnih biljaka na tretmanu najvišom koncentracijom floretina povećala se samo za 1 mm, dok se kod kontrole povećala za 1,6 mm. Najizraženija inhibicija izduživanja izdanaka zabeležena je nakon 15 dana tretmana 1500 μM floretinom i iznosila je 30,4% (**Slika 16H**), što ukazuje na slabiji inhibični efekat floretina na BSIM u odnosu na isti tretman na SIM podlozi (**Slika 15H**; 54,2%, 15 dana, 1500 μM).

4.1.2.5. Uticaj produženog tretmana floretinom na morfološke karakteristike juvenilnih biljaka

Produženi tretman floretinom (28 dana) izazvao je izraženije promene kod biljaka *A. thaliana* u odnosu na tretmane kraćeg trajanja (5, 10 i 15 dana) (**Slika 17**). Koren, kao i izdanci kontrolnih jedinki, bili su dobro razvijeni i zdravi. Korenovi su bili bele boje, dugački i lepo razgranati sa vidljivim primarnim i sekundarnim bočnim korenovima.

Listovi su se karakterisali intenzivnom zelenom bojom, za razliku od kotiledona koji su bili hlorotični i senescentni, što predstavlja deo normalnog razvoja juvenilnih biljaka. Nakon 28 dana gajenja u kulturi *in vitro*, na kontrolnim jedinkama bile su приметne i cvetne stabljike (**Slika 17A**). Nasuprot tome, jedinke tretirane floretinom imale su sitnije rozete sa hlorotičnim kotiledonima i listovima, dok su korenovi bili svetlo braon boje ili potpuno nekrotični (**Slika 17B-D**). Broj hlorotičnih listova povećavao se sa koncentracijom floretina u hranljivoj podlozi. Nakon 28 dana, samo nekoliko biljaka je preživelo na višim koncentracijama floretina (1000 μM i 1500 μM ; **Slika 17D**).



Slika 17. *A. thaliana* nakon 28 dana tretmana floretinom (produženi tretman). Biljke su gajene vertikalno u Petri-kutijama na $\frac{1}{2}$ MS čvrstim hranljivim podlogama bez saharoze i mio-inozitola. **A** – Kontrola; **B** – Tretman 250 μ M floretinom; **C** – Tretman 500 μ M floretinom; **D** – Tretman 1000 μ M floretinom. Bar: 8 mm za (A), 4 mm za (B), 2 mm za (C) i (D).

4.1.3. Uticaj floretina na rastenje i prirast mase juvenilnih biljaka tretiranih posredstvom korena

Primena prirodnih fitotoksičnih jedinjenja u cilju suzbijanja korovskih vrsta u praksi može biti sprovedena prskanjem ili putem irigacije, prilikom koje biljka stupa u kontakt sa aktivnom supstancom isključivo preko korenovog sistema. U skladu sa tim, dizajniran je eksperiment u kome je praćen efekat floretina usvojenog posredstvom korena, na morfološke karakteristike i prirast mase biljaka *A. thaliana* u uslovima *in vitro*. Eksperimentalni dizajn podrazumevao je gajenje juvenilnih biljaka na podlozi bez floretina u trajanju od sedam dana, a zatim njihovo prenošenje na hranljive podloge sa floretinom (0, 250, 500 i 1000 μ M) pažljivim zaranjanjem korena u podlogu, čime je izbegnut direktan kontakt izdanka sa floretinom i mogućnost njegovog usvajanja preko nadzemnih delova juvenilnih biljaka. Na ovaj način simuliran je proces tretmana biljaka putem irigacije, na način prikladan uslovima *in vitro* kulture, koji bi bio uporediv sa rezultatima prikupljenim iz prethodno opisanih *in vitro* eksperimenata.

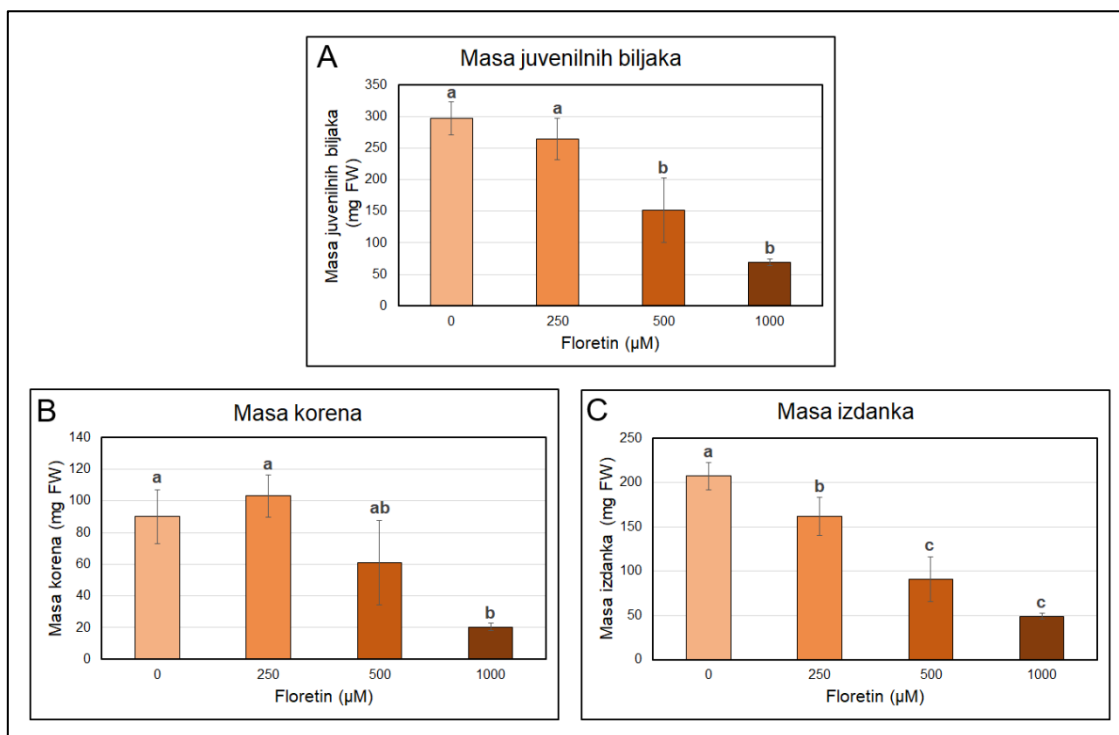


Slika 18. Efekat floretina na *A. thaliana* nakon 28 dana tretmana posredstvom korena. Juvenilne biljke su gajene na $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi sedam dana, nakon čega su prenesene na hranljivu podlogu obogaćenu floretinom (0, 250, 500 i 1000 μ M). **A** – Kontrola; **B** – Tretman 250 μ M floretinom; **C** – Tretman 500 μ M floretinom; **D** – Tretman 1000 μ M floretinom. Bar: 10 mm.

Vizuelnim pregledom i merenjem biljaka *A. thaliana* nakon 28 dana tretmana floretinom ustanovljeno je njegovo negativno delovanje na rastenje i razvoj, koje se ogledalo u veličini, izgledu i masi kako korena, tako i nadzemnih delova biljke (**Slike 18 i 19**).

Najizraženije promene uočene su na korenovom sistemu biljaka izloženih floretinu i manifestovale su se kroz skraćenje dužine korena i promene njegove boje iz prirodno bele u žuto-braon nijanse. Ovi efekti bili su izraženiji na podlogama sa višim koncentracijama floretina (**Slika 18B-D**). Merenjem mase korena potvrđeno je njeno smanjenje pri svim koncentracijama floretina, dok je statistički značajna redukcija zabeležena isključivo pri najvišoj primenjenoj koncentraciji od 1000 μ M (**Slika 9B**). ’

Tretman floretinom ispoljio je inhibitorski efekat i na izdanke, uprkos činjenici da oni nisu bili u direktnom kontaktu sa podlogom. U poređenju sa kontrolnim biljkama, tretirane jedinke imale su sitnije i svetlije obojene listove, kao i kraće cvetne stabljike (**Slika 18**). Kod kontrolnih biljaka uočeno je bočno grananje stabljike, dok ova pojava nije bila prisutna kod biljaka izloženih floretinu. Formiranje stabljika sa cvastima bilo je značajno usporeno (**Slika 18A-C**), dok je pri primeni floretina u koncentraciji od 1000 μ M u potpunosti izostalo (**Slika 18D**). Sveža masa izdanaka bila je statistički značajno smanjena pri svim primenjenim koncentracijama floretina, pri čemu je intenzitet smanjenja pokazivao dozno-zavisani trend (**Slika 19C**). Uočena redukcija mase, zajedno sa izraženim morfološkim promenama izdanaka, ukazuje na to da floretin ostvaruje negativan uticaj na nadzemne delove biljke nezavisno od odsustva njihovog direktnog kontakta sa ovim jedinjenjem, što sugerise transport floretina iz korena u nadzemne delove biljke.

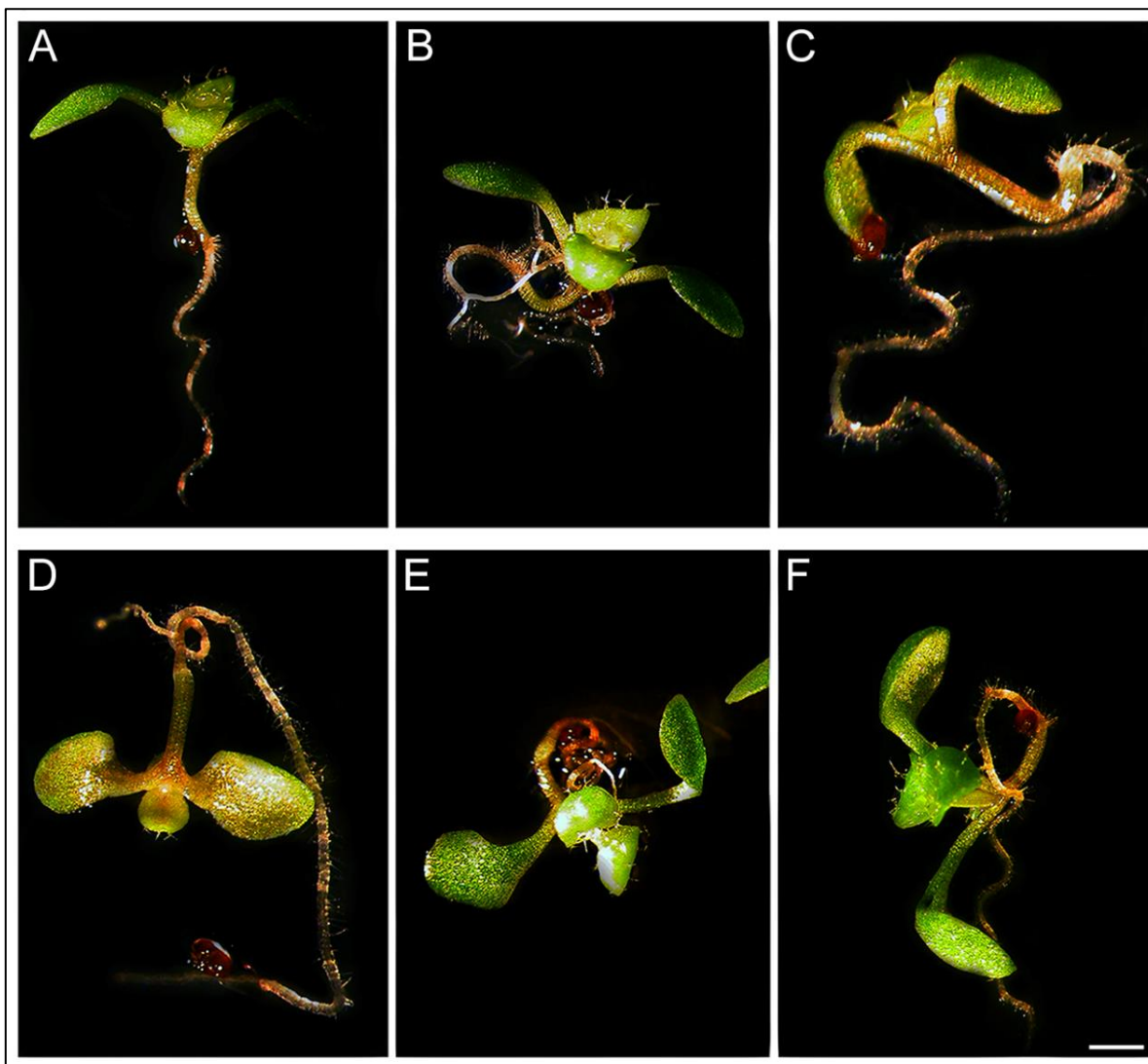


Slika 19. Efekat floretina na svežu masu *A. thaliana* nakon 28 dana tretmana posredstvom korena. Juvenilne biljke su gajene na ½MS hranljivoj podlozi 7 dana, nakon čega su prenesene na hranljivu podlogu obogaćenu floretinom (0, 250, 500 i 1000 µM). **A** – Masa celih biljaka; **B** – Masa korena; **C** – Masa izdanka. Histogrami predstavljaju srednje vrednosti sa standardnim greškama (SE), a slova na graficima predstavljaju rezultat Fišerovog testa najmanje značajne razlike ($P < 0,05$). Ista slova označavaju da razlike u srednjim vrednostima tretmana nisu statistički značajne. Eksperiment je postavljen u četiri biološka ponavljanja (teglice) po tretmanu (koncentraciji floretina) sa po pet juvenilnih biljaka ($n=20$). FW – sveža masa biljnog tkiva (eng. *fresh weight*).

4.1.4. Uticaj floretina na gravitropski odgovor i indukciju razvojnih deformacija

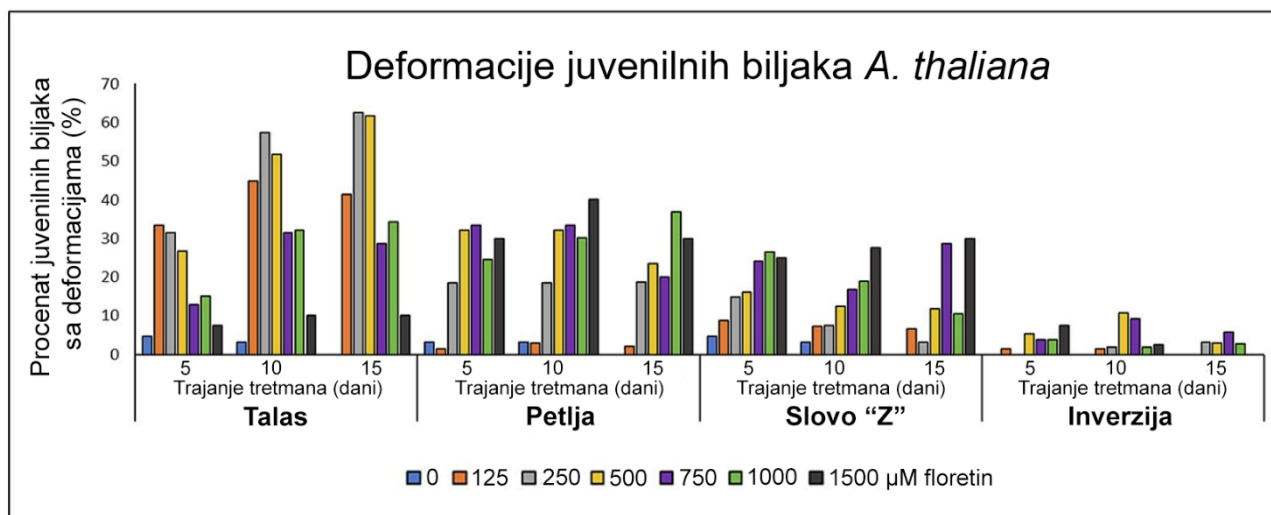
Tretman floretinom uzrokovao je brojne promene u morfologiji juvenilnih biljaka, pre svega pojavu razvojnih deformacija. Na osnovu izgleda korena i hipokotila, kao i položaja epikotila, uočene deformacije klasifikovane su u četiri osnovne grupe: deformacije u vidu (i) talasa, (ii) petlje, (iii) latiničnog slova „Z” i (iv) inverzije. Juvenilne biljke sa deformacijama u vidu talasa imali su pravilno razvijen hipokotil i epikotil, dok su korenovi rasli pozitivno gravitropski formirajući veliki broj sitnih talasa, dajući korenu izgled „cik-cak” linije (**Slika 20A**).

Za razliku od njih, kod juvenilnih biljaka sa deformacijama u obliku petlje i slova „Z”, hipokotil i koren izgubili su normalno gravitropsko ponašanje i rasli su nepravilno, formirajući oblik petlje ili latiničnog slova „Z” (**Slika 20B, C**). Kod nekih juvenilnih biljaka zabeležene su deformacije tipa inverzije kod kojih su hipokotil, kotiledoni i epikotil rasli u suprotnom smeru od očekivanog, odnosno pozitivno gravitropski (**Slika 20D**). U nekim slučajevima uočene su kombinacije više tipova deformacija, kao na primer inverzija i petlja (**Slika 20E**) ili inverzija i talas (**Slika 20F**).



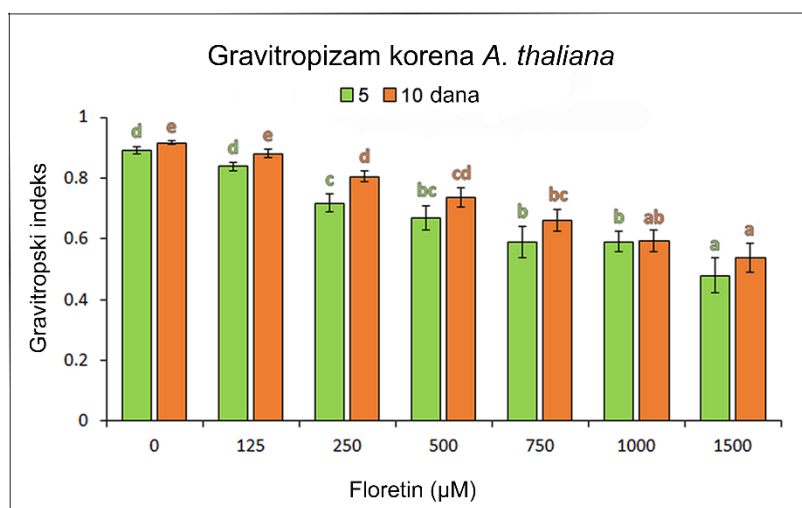
Slika 20. Razvojne deformacije juvenilnih biljaka *A. thaliana* indukovane floretinom: **A** – Talas, **B** – Petlja, **C** – Oblik slova „Z“, **D** – Inverzija, **E** – Petlja i inverzija, **F** – Talas i inverzija. Bar: 2 mm. Juvenilne biljke su gajene vertikalno u Petri kutijama na ½MS hranljivim podlogama sa različitim koncentracijama floretina (125-1500 µM). Bar: 1 mm.

Deformacije juvenilnih biljaka postale su vidljive relativno brzo nakon klijanja semena. Učestalost deformacija zavisila je od trajanja tretmana i koncentracije floretina (**Slika 21**). Tretman floretinom u srednjem opsegu koncentracija, pogotovu na 500 µM, indukovao je pojavu najvećeg broja deformacija. Na tretmanima floretinom u koncentracijama od 125 do 500 µM najučestalije su bile deformacije u obliku talasa, mada su se talasi javljali i na višim koncentracijama, ali sporadično. U nekim slučajevima, oblik deformacije menjao se tokom trajanja tretmana. Tako su ponekad deformacije u obliku latiničnog slova „Z“ prelazile u talase, a inverzije u petlje.



Slika 21. Procentat juvenilnih biljaka *A. thaliana* sa deformacijama. Juvenilne biljke su gajene vertikalno u Petri-kutijama na $\frac{1}{2}$ MS čvrstim hranljivim podlogama sa floretinom (0-1500 µM). Prisustvo deformacija je zabeleženo 5, 10. i 15. dana tretmana. Eksperiment je izveden u tri biološka ponavljanja sa po 30 semena po tretmanu (n=90).

Pojava velikog broja deformacija već u prvim danima razvoja juvenilnih biljaka ukazivala je na poremećaj gravitropskog odgovora ili čak na njegov potpuni gubitak na tretmanima visokim koncentracijama floretina. Inhibicija uobičajenog gravitropskog odgovora korena potvrđena je i kvantifikovana merenjem vertikalnog gravitropskog indeksa korena (VGI) nakon 5 i 10 dana tretmana. Analizom je pokazano da je VGI juvenilnih biljaka bio značajno smanjen na svim koncentracijama floretina iznad 125 µM i da je imao dozno-zavisani opadajući trend. Efekat je bio najizraženiji na tretmanu sa 1500 µM floretinom, gde je zabeleženo smanjenje VGI za 46,2%, odnosno 41,2% u poređenju sa kontrolom nakon 5 i 10 dana tretmana (**Slika 22**).

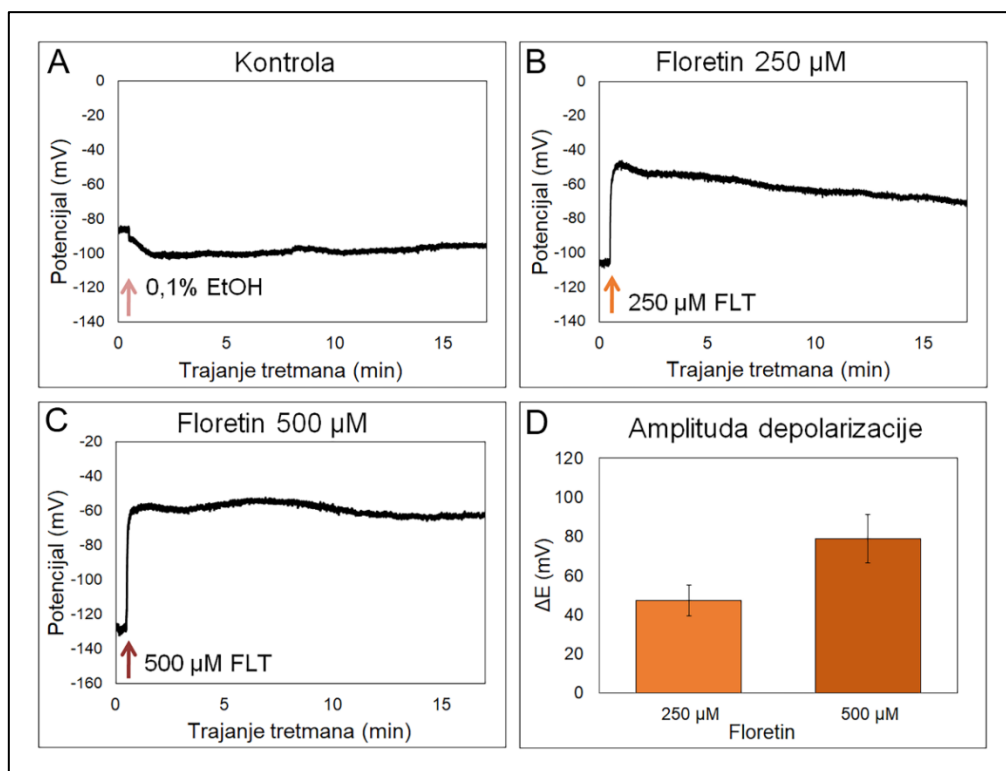


Slika 22. Vertikalni gravitropski indeks (VGI) korena juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Juvenilne biljke su gajene vertikalno u Petri-kutijama na $\frac{1}{2}$ MS čvrstim hranljivim podlogama sa floretinom (0-1500 µM). VGI je određen 5. i 10. dana tretmana. Histogrami predstavljaju srednje vrednosti VGI sa standardnim greškama, a različita slova iznad stubića označavaju statistički značajne razlike između tretmana prema Fišerovom LSD testu ($P < 0,05$). Eksperiment je izveden u tri biološka ponavljanja sa po 30 semena po tretmanu (n=90).

4.2. ELEKTROFIZIOLOŠKA ANALIZA EFEKTA FLORETINA NA EPIDERMALNE ČELIJE KORENA

U cilju analize ranih događaja iniciranih prvim kontaktom korenovog sistema *A. thaliana* sa floretinom, kontinuirano su praćene promene membranskog potencijala epidermalnih ćelija u zreloj zoni primarnog korena nakon egzogene primene floretina. Nakon uspešne penetracije mikroelektrode u epidermalnu ćeliju korena, u roku od nekoliko minuta uspostavljen je stacionarni membranski potencijal sa prosečnom vrednošću od $-118,65 \pm 4,63$ mV. Nakon toga, u sistem je uveden etanolni rastvarač (0,1 % (v/v)) kao kontrola. Na **slici 23A** prikazan je reprezentativni zapis koji ilustruje efekat primene etanolnog rastvarača, odnosno izostanak promene membranskog potencijala epidermalnih ćelija korena.

Za razliku od kontrolnog tretmana, egzogena primena floretina u finalnim koncentracijama od 250 i 500 μ M izazvala je naglu depolarizaciju membrane epidermalnih ćelija korena u prvom minutu nakon uvođenja floretina (**Slike 23B, C**). Membranski potencijal se stabilizovao na približno -60 mV između 12. i 17. minuta tretmana. Amplituda depolarizacije izazvane floretinom (ΔE) na tretmanu sa 500 μ M ($78,83 \pm 12,35$ mV) bila je za 40 % veća u odnosu na tretman sa 250 μ M ($47,14 \pm 7,87$ mV) (**Slika 23D**).



Slika 23. Reprezentativni primeri originalnih zapisa promena membranskog potencijala ćelija epidermisa zrele zone korena petodnevnih juvenilnih biljaka *A. thaliana* nakon egzogene aplikacije floretina u elektrofiziološki rastvor oko korena (**A** – Kontrola (0,1% etanol); **B** – 250 μ M floretin; **C** – 500 μ M floretin; **D** – Prosečna vrednost amplituda depolarizacije (ΔE) membranskog potencijala sa standardnim greškama (SE) pri tretmanima 250 i 500 μ M floretinom. Membranski potencijal je meren kod pet juvenilnih biljaka za svaki tretman. Studentovim *t*-testom nije utvrđena značajna razlika u prosečnim amplitudama depolarizacije između tretmana 250 i 500 μ M floretinom, na nivou značajnosti $P < 0,05$.

Iako uočena razlika u amplitudi depolarizacije između pomenutih tretmana nije pokazala statističku značajnost, ovi rezultati potvrđuju postojanje dozno-zavisnog efekta floretina na veličinu promene membranskog potencijala epitela korena. Ova zapažanja potvrđuju da floretin već pri prvom kontaktu ostvaruje snažan fiziološki efekat na korenov sistem, potencijalno delujući kao rani okidač za naredne promene u rastenju i razviću juvenilnih biljaka.

4.3. ANALIZA HISTOLOŠKE ORGANIZACIJE KORENA JUVENILNIH BILJAKA

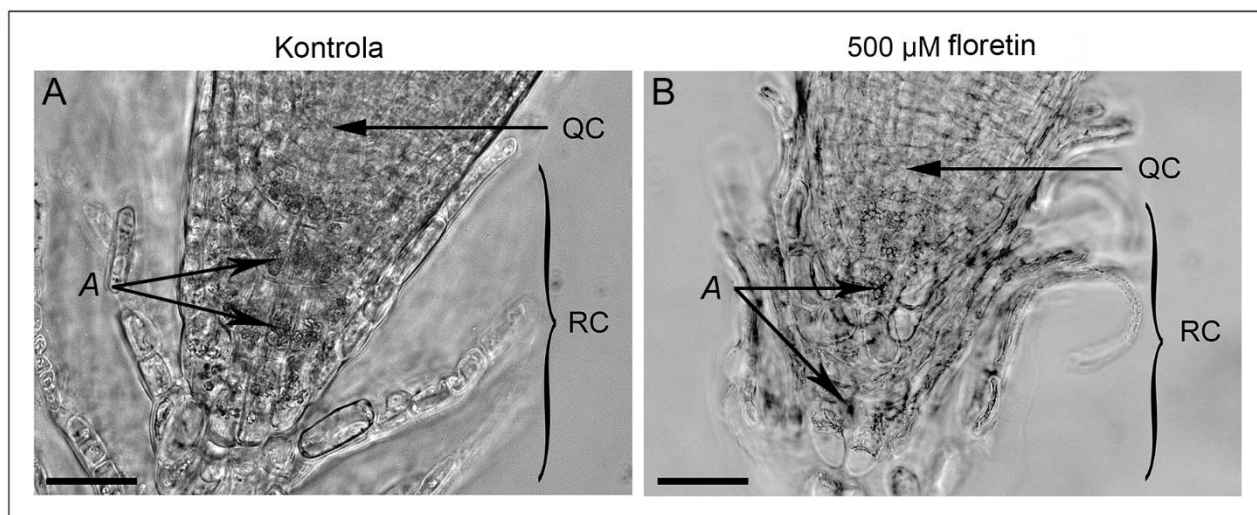
4.3.1. Uticaj floretina na histološku organizaciju primarnog korena

U cilju evaluacije efekata floretina na histološku organizaciju korena juvenilnih biljaka, sprovedena je histološka analiza uzoraka zasnovana na primeni svetlosne mikroskopije nativnih preparata primarnog korena (bez fiksacije i histološkog bojenja). Na ovaj način analizirane su razlike u arhitekturi korena kontrolnih i juvenilnih biljaka gajenih na hranljivim podlogama sa 500 μ M floretinom u trajanju od 5 i 10 dana. Posmatrane su sledeće zone korena: korenova kapa (eng. *root cap*, RC), meristemska zona (eng. *meristematic zone*, MZ) i elongaciona zona (eng. *elongation zone*, EZ).

U kontrolnim (netretiranim) uzorcima, korenova kapa je ispoljila očuvanu arhitekturu i jasnu zonalnu organizaciju (**Slika 24A**). Čelije kolumele su bile pravilnog, najčešće izduženo-prizmatičnog oblika, uredno raspoređene u uzdužne redove, sa jasno izraženim polaritetom i gustim sadržajem amiloplasta, koji su lokalizovani pretežno u bazalnim delovima ćelija. Amiloplasti su u ovim ćelijama delovali kompaktnije, sa jasno diferenciranim skrobnim zrnima, što je ukazalo na njihovu aktivnu ulogu u gravitacionoj percepciji. Apikalna zona kape je sadržala sloj odumirućih ćelija koje su se ljuštile sa bazalnih slojeva kolumele, doprinoseći formiranju sluzavog omotača na površini apeksa.

Promene u izgledu i organizaciji korenove kape bile su posebno izražene nakon 10 dana gajenja juvenilnih biljaka na podlogama sa floretinom (**Slika 24B**). Mikroskopska analiza uzoraka korena nakon tretmana floretinom je otkrila izražene histološke i morfološke aberacije, koje su se najizraženije manifestovale u zoni kolumele i apikalnom regionu kape. Čelije kolumele su bile značajno redukovanih dimenzija, sa narušenom organizacijom i polaritetom. Bio je prisutan izražen gubitak strukturne koherentnosti, dok su amiloplasti, koji su se u kontrolnim uzorcima jasno identifikovali i pravilno lokalizovali, u tretiranim primercima bili slabije izraženi, difuzno raspoređeni i morfološki nediferencirani. Ove promene ukazuju na inhibiranu funkciju gravitacione percepcije i potencijalnu redistribuciju skroba unutar ćelija kolumele.

Najizraženije promene uočene su u apikalnom delu korenove kape, gde se jasno identifikuju višeslojni kompleksi ćelija koje pokazuju znakove napredne degeneracije (**Slika 24B**). Ove ćelije su hipertrofirane, nepravilne morfologije i izražene strukturne dezorganizacije, sa vidljivim gubitkom ćelijskih kontura i međusobne povezanosti. Njihova separacija od bazalnih slojeva kolumele sugerise intenzivirane procese ćelijske smrti, što ukazuje na ozbiljno narušavanje integriteta ovog zaštitno-senzornog tkiva. Ukupno posmatrano, opisane morfološke promene impliciraju da tretman floretinom značajno interferira sa normalnom ontogenezom i funkcionalnom stabilnošću korenove kape.

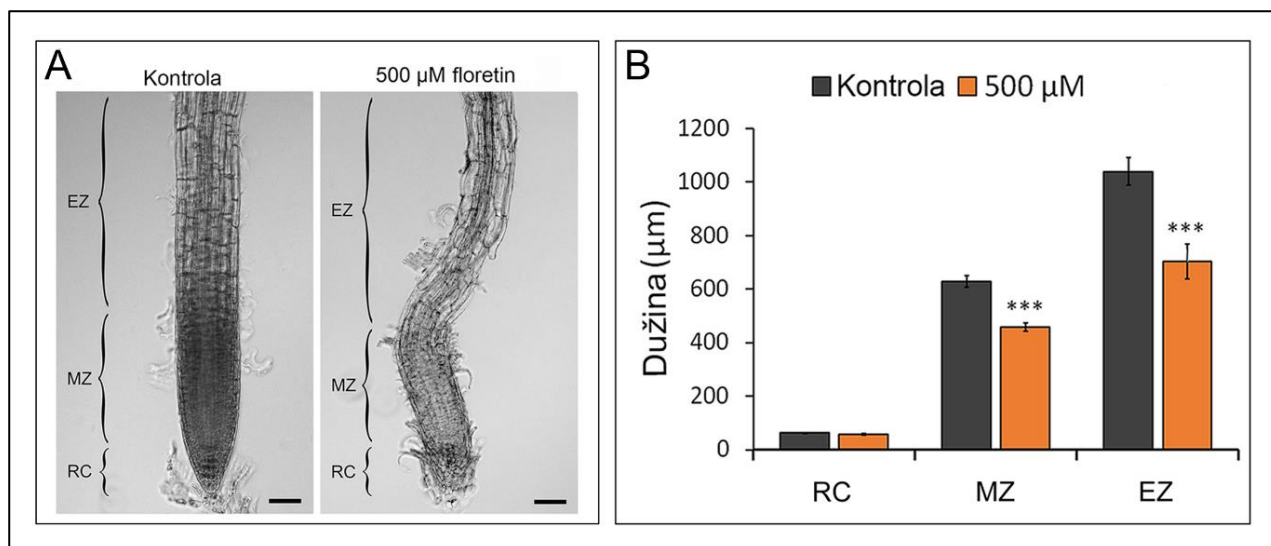


Slika 24. Uticaj floretina na histološku organizaciju apeksa korena juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Juvenilne biljke su gajene vertikalno 10 dana na $\frac{1}{2}$ MS hranljivim podlogama bez (kontrola) ili sa dodatkom 500 μ M floretina. **A** – Kontrola; **B** – Tretman floretinom. A – amiloplasti; QC – mirujući centar (eng. *quiescent center*); RC – korenova kapa (eng. *root cap*). Snimak je napravljen pod svetlosnim mikroskopom Axiovert (Carl Zeiss, Jena, Nemačka). Bar: 25 μ m.

U kontrolnim juvenilnim biljkama, ćelije meristemske zone korena su pravilnog oblika, međusobno čvrsto povezane i jasno organizovane u kompaktan tkivni raspored. Uočava se kontinualna organizacija od apikalne zone ka bazalnim delovima korena, što ukazuje na stabilnu ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju (**Slika 24A**). Nasuprot tome, u tretiranim uzorcima uočavaju se značajne promene u morfologiji i rasporedu ćelija. Ćelije meristemske zone uočljivo su krupnije, nepravilnog oblika i dezorganizovanog rasporeda sa smanjenom ćelijskom kohezivnošću (**Slika 24B**).

U elongacionoj zoni, ćelije epidermisa i korteksa kod tretiranih biljaka izraženo su hipertrofirane, ali istovremeno značajno kraće od onih u netretiranim uzorcima (**Slika 25A**). Dodatno, u pojedinim regionima beleži se delimično odvajanje epidermalnih ćelija od kortikalnog sloja, što je naročito izraženo u meristenskoj i elongacionoj zoni. Rezultati morfometrijske analize kod tretiranih biljaka potvrdili su značajno skraćanje dužine meristemske i elongacione zone za 30%, odnosno 39% u odnosu na kontrolne juvenilne biljke (**Slika 25B**).

Uočeni stepen skraćanja meristemske i elongacione zone, zajedno sa strukturnim oštećenjima epidermisa, ukazuje na izraženo fitotoksično delovanje floretina na koren juvenilnih biljaka vrste *A. thaliana*, naročito u zonama aktivne ćelijske deobe i rastejanja.



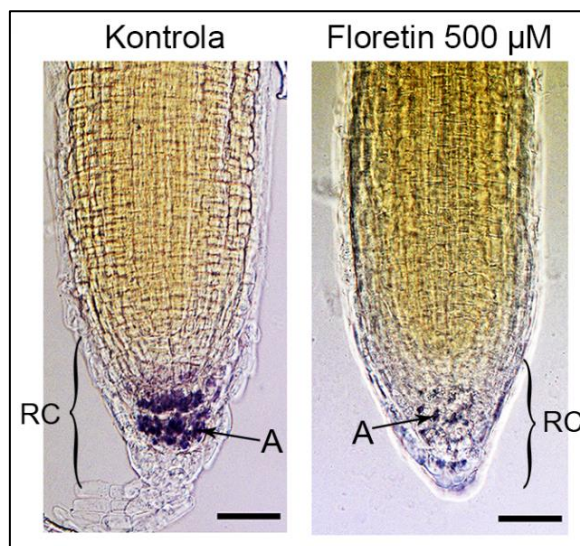
Slika 25. Uticaj floretina na histološku organizaciju korena juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Juvenilne biljke su gajene vertikalno na ½MS hranljivim podlogama bez (kontrola) ili sa dodatkom 500 µM floretina. **A** – Histološka organizacija primarnog korena juvenilnih biljaka *A. thaliana* nakon 10 dana tretmana (kontrola i floretin); bar: 50 µm. **B** – Dužina zona primarnog korena nakon 5 dana tretmana. Histogrami predstavljaju srednje vrednosti dužine zona primarnog korena 20 juvenilnih biljaka iz dva nezavisna eksperimenta. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike pri $P < 0,001$ (***) na osnovu Studentovog *t*-testa nezavisnih uzoraka. RC – korenova kapa, MZ – meristemska zona, EZ – zona izduživanja.

4.3.2. Uticaj floretina na veličinu i distribuciju amiloplasta u ćelijama kolumele

Metodom bojenja skrobnih zrna Lugolovim reagensom i mikroskopskim pregledom vrhova korena juvenilnih biljaka *A. thaliana*, otkrivene su značajne razlike u veličini i distribuciji amiloplasta u ćelijama kolumele kontrolnih i juvenilnih biljaka tretiranih 500 µM floretinom nakon 10 dana tretmana. Korenova kapa juvenilnih biljaka iz kontrolne grupe odlikovala se izraženom prisutnošću velikog broja jasno vidljivih i morfološki razvijenih amiloplasta, koji su bili gusto raspoređeni unutar ćelija kolumele. Uočeni amiloplasti su krupni, sa jasno izraženim skrobnim zrnima (**Slika 26**). Takva raspodela i izgled amiloplasta ukazuje na funkcionalnu zrelost ćelija kolumele i očuvanu percepciju gravitropskog stimulusa.

Suprotno tome, kod juvenilnih biljaka tretiranih floretinom zapažen je značajan kvalitativni i kvantitativni poremećaj u prisustvu amiloplasta. U ćelijama kolumele juvenilnih biljaka tretiranih floretinom uočava se znatno manji broj amiloplasta, sitnijih dimenzija i slabije razvijenih u poređenju sa onima u kontrolnim uzorcima.

Ovakav poremećaj u distribuciji amiloplasta može se dovesti u vezu sa prethodno opisanim razvojnim deformacijama i inhibicijom gravitropskog odgovora kvantifikovanom preko smanjenja VGI (Poglavlje 4.1.4).



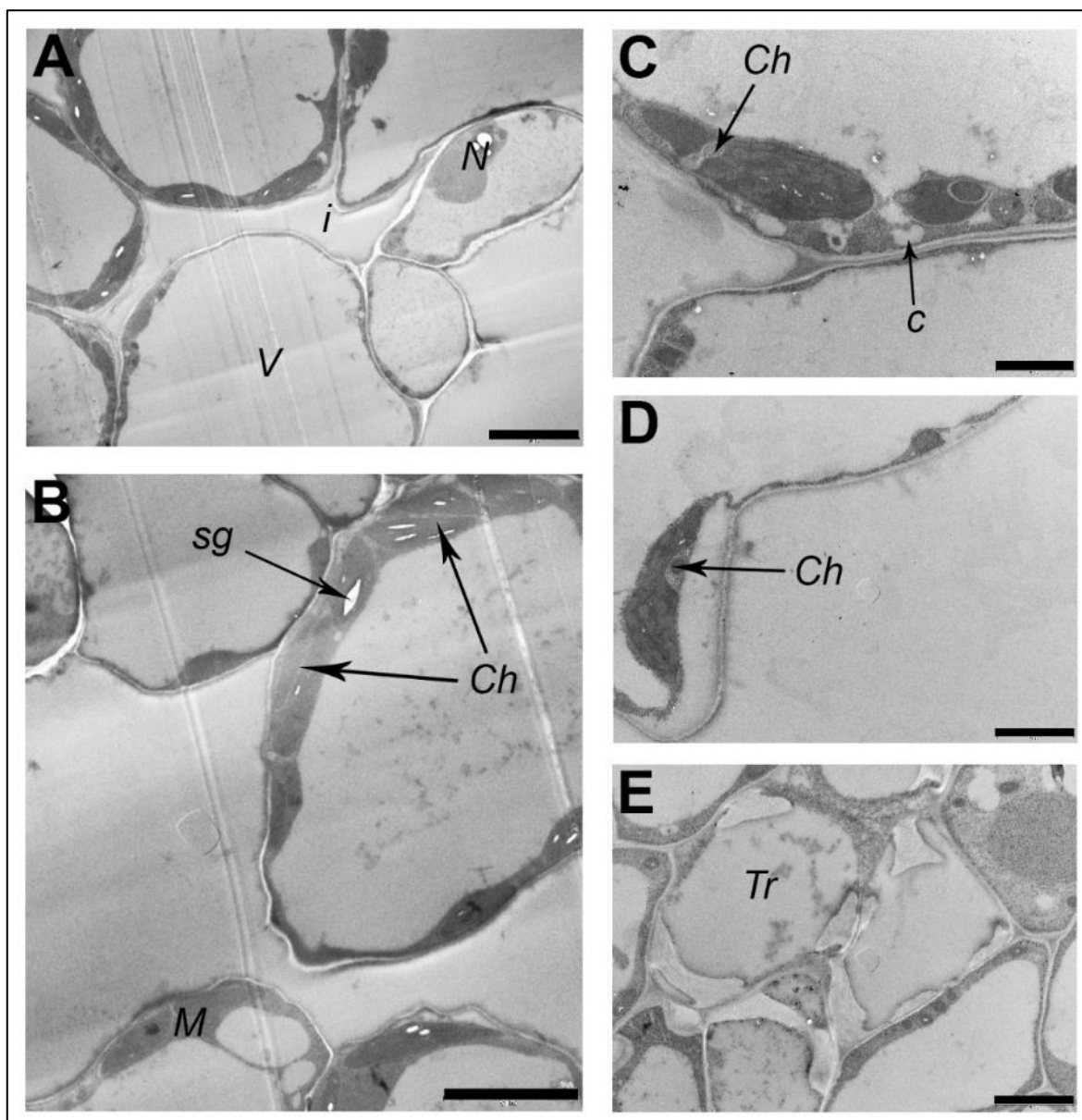
Slika 26. Uticaj floretina na veličinu i distribuciju amiloplasta u ćelijama kolumele korenove kape (eng. *root cap*, RC) juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Juvenilne biljke su gajene vertikalno na ½MS hranljivim podlogama bez (kontrola) i sa dodatkom 500 µM floretina i obojene Lugolovim rastvorom nakon 10 dana tretmana. Ljubičasto obojena skrobna zrna su vidljiva u ćelijama kolumele. A – amiloplasti. Bar: 50 µm.

4.4. ANALIZA ULTRASTRUKTURNIH KARAKTERISTIKA MEZOFILNIH ĆELIJA JUVENILNIH BILJAKA

U cilju detekcije i analize efekata floretina na ultrastrukturu ćelija fotosintetski aktivnog tkiva juvenilnih biljaka *A. thaliana*, korišćena je metoda transmisione elektronske mikroskopije (TEM) primenjena na uzorcima listova juvenilnih biljaka podvrgnutim tretmanu 500 µM floretinom u trajanju od 10 dana (kratkotrajni tretman) i 28 dana (produženi tretman).

4.4.1. Ultrastrukturne promene mezofilnih ćelija nakon 10 dana tretmana floretinom

Analizom preparata odsečaka listova kontrolnih juvenilnih biljaka *A. thaliana* starosti 10 dana, utvrđeno je da se mezofilne ćelije odlikuju pravilnim oblikom i veličinom. One poseduju krupnu, centralno postavljenu vakuolu i uočljivo jedro smešteno u blizini ćelijskog zida, i koje je od njega odvojeno tanjim slojem citoplazme homogene granulacije. Uočeni međućelijski prostori bili su standardnog oblika i dimenzija (**Slika 27A**). U kontrolnim ćelijama uočen je manji broj mitohondrija i brojni hloroplasti pravilnog, sočivastog oblika, pozicionirani duž ćelijske membrane. U hloroplastima su uočena skrobna zrna, kao i odsustvo devijacija u strukturnoj organizaciji (**Slika 27B**). Opisane ultrastrukturne karakteristike mezofilnih ćelija kontrolnih listova odražavaju očuvanu morfološku organizaciju i fiziološku stabilnost, i predstavljaju referentni model za analizu potencijalnih promena kod tretiranih uzoraka.



Slika 27. Efekat floretina na ultrastrukturu mezofilnih ćelija juvenilnih biljaka *A. thaliana* nakon 10 dana tretmana. Klijanci su gajeni vertikalno 10 dana na $\frac{1}{2}$ MS hranljivim podlogama bez (kontrola) ili sa dodatkom 500 μ M floretina. **Kontrola (A i B):** A – Ćelije pravilnog oblika sa krupnom vakuolom (V), jedrom (N) i normalnim međućelijskim prostorima (i); B – Mitohondrije (M) i hloroplasti (Ch) pravilne strukture sa skrobnim zrnima (sg). **Tretman floretinom (C-E):** C – Neravnomerno granulisana citoplazma (c) sa površinama nepravilnog oblika i smanjene gustine, hloroplasti (Ch) sa specifičnim lezijama (l) i nepravilnom distribucijom tilakoida; D – Hloroplasti (Ch) nepravilne strukture sa lezijama (l), koji su zajedno sa ostatkom protoplasta odvojeni od ćelijskog zida; E – Presek ksilema (Tr – traheida). Prikazane su reprezentativne mikrografije iz tri nezavisna eksperimenta. Bar: 5 μ m.

Desetodnevni tretman 500 μ M floretinom doveo je do izražene promene u ultrastrukturi mezofilnih ćelija juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Centralni deo ćelije zauzimala je krupna vakuola, dok je citoplazma, slično kao kod kontrolnih ćelija, bila raspoređena duž perifernog dela ćelije. Citoplazma je često ispoljavala neravnomernu granulaciju, pri čemu su uočavana područja visoke elektronske gustine, kao i regioni niske elektronske gustine raspoređeni u vidu nepravilno oblikovanih zona (**Slika 27C**). Kod brojnih ćelija registrovano je odvajanje čitavog protoplasta od ćelijskog zida i njegovo povlačenje ka centralnom delu ćelije (**Slika 27D**). Hloroplasti su pokazivali nepravilnu

organizaciju tilakoida strome i grana, uz pojavu specifičnih lezija (**Slika 27C, D**). Zapažen je manji broj skrobnih zrna u odnosu na kontrolne ćelije. Struktura ćelijskog zida uglavnom je ostajala očuvana. Za razliku od mezofilnih ćelija, u elementima ksilema nisu zabeležena oštećenja (**Slika 27E**).

Dobijeni rezultati jasno sugerišu da tretman floretinom selektivno ugrožava funkcionalni integritet mezofilnih ćelija, narušavajući organizaciju tilakoidnog sistema hloroplasta uz pojavu specifičnih lezija, dok struktura ksilema ostaje nepromenjena, ukazujući na diferencijalnu osetljivost tkiva.

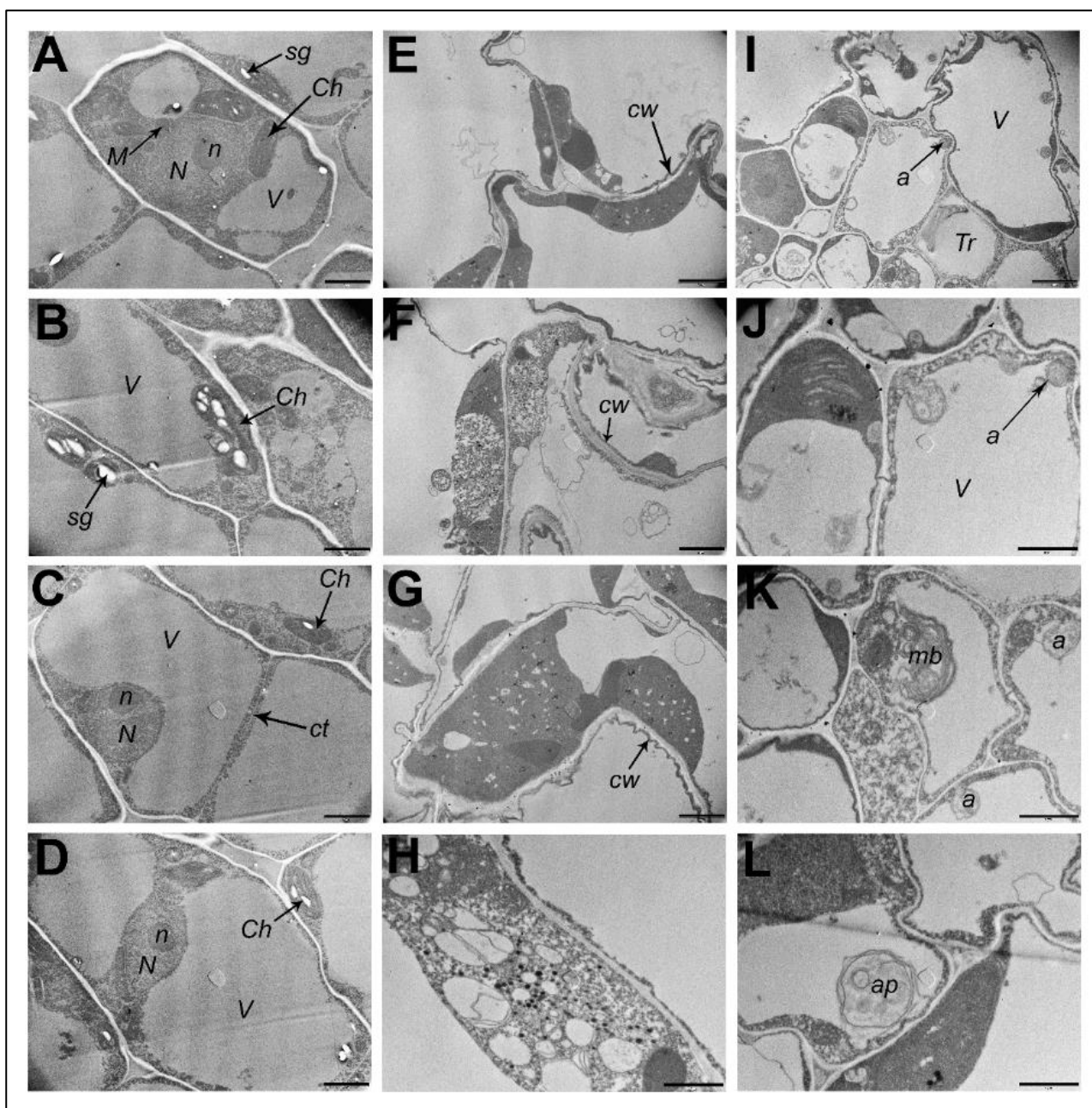
4.4.2. Ultrastrukturne promene mezofilnih ćelija nakon 28 dana tretmana floretinom

Analizom preparata odsečaka listova kontrolnih juvenilnih biljaka *A. thaliana* starosti 28 dana, utvrđeno je da su mezofilne ćelije bile pravilnog oblika i strukture, sa nekoliko manjih vakuola (**Slika 28A**) ili dominantnom vakuolom u centralnom delu ćelije (**Slika 28B**). Ravnomerno granulirana citoplazma najčešće se uočavala duž ćelijskog zida (**Slika 28A, B**), dok je u pojedinim slučajevima bila smeštena između dve vakuole u vidu tanke citoplazmatske niti u centralnom delu ćelije (**Slika 28C**). Ćelije su najčešće posedovale krupno jedro, sa uočljivim jedarcetom, koje je bilo smešteno u centralnom delu ćelije (**Slika 28A, D**). Ponekad su se mogle uočiti ćelije sa jedrom smeštenim u blizini ćelijskog zida (**Slika 28C**). Hloroplasti sočivastog oblika sa sitnim skrobnim zrnima i pravilnom organizacijom tilakoida strome i grana, kao i mitohondrije normalne veličine i izgleda, bili su smešteni u blizini ćelijske membrane (**Slika 28A-D**).

Produženo izlaganje floretinu u trajanju od 28 dana indukovalo je izražene promene u ultrastrukтури mezofilnih ćelija juvenilnih biljaka. Oblik i debljina ćelijskog zida bili su značajno izmenjeni u smislu lokalnog istanjenja (**Slika 28E**) ili zadebljanja (**Slika 28F**), dok su se u nekim ćelijama uočavali naizmenično raspoređeni segmenti veće ili manje debljine, što je davalo ćelijskom zidu testerasti izgled (**Slika 28G**). Na preparatima tretiranih uzoraka uočene su ćelije različitog stepena oštećenja. Neke od ćelija bile su pro-apoptične sa karakterističnim piknotičkim jedrom i tankom zonom veoma kondenzovane citoplazme odvojene od ćelijskog zida (**Slika 28E**). Kod teško oštećenih ćelija, organele su bile potpuno dezorganizovane i neprepoznatljive, dok su se u citoplazmi uočavale mnogobrojne vezikule (**Slika 28H**). Skrobna zrna skoro nisu bila uočljiva. U vakuolama pojedinih ćelija, u blizini tonoplasta, izdvajale su se vezikule različitih veličina koje su po karakteristikama odgovarale autofagičnim telima (**Slika 28I**). Detaljnom analizom zaključeno je da se vezikule formiraju od invaginacija tonoplasta koje sadrže citoplazmatski materijal, što ukazuje na proces mikroautofagije (**Slika 28J, K**). Krupnije vezikule ispunjene inkluzijama različite veličine i/ili gustim multilamelarnim strukturama, a koje po strukturi odgovaraju autofagozomima, odnosno rezidualnim telima nalik mijelinu, ukazivale su na proces makroautofagije (**Slika 28K, L**).

Rezultati analize ultrastrukturnih karakteristika mezofilnih ćelija ukazuju da se kumulativni efekat ovog dihidrohalkona, koji je na morfološkom nivou zabeležen kod juvenilnih biljaka podvrgnutih produženom tretmanu floretinom (Poglavlje 4.1.2.5), velikim delom zasniva na poremećajima ultrastrukture i funkcionalnog integriteta ćelija mezofila. Pojava mikro- i makroautofagije, uočena nakon produženog tretmana, sugerise adaptivni odgovor ćelija usmeren ka preživljavanju u uslovima gladovanja, odnosno na hranljivim podlogama bez egzogeno dodate saharoze, kada je proces fotosinteze onemogućen usled oštećenja hloroplasta i fotosintetskog aparata.

Ovi nalazi potvrđuju da je primarni cilj delovanja floretina fotosintetski sistem hloroplasta, a posledično i metabolička stabilnost mezofilnih ćelija.



Slika 28. Uticaj floretina na ultrastrukturu mezofilnih ćelija juvenilnih biljaka *A. thaliana* nakon 28 dana tretmana. Juvenilne biljke su gajene vertikalno 28 dana na $\frac{1}{2}$ MS hranljivim podlogama bez (kontrola) ili sa dodatkom 500 μ M floretina. **Kontrola (A-D):** A – Ćelije pravilnog oblika sa vakuolama (V), krupnim jedrom (N), jedarcetom (n), hloroplastima (Ch) sa skrobnim zrnima (sg) i mitohondijama (M); B – Krupna vakuola (V) u sredini ćelije, hloroplasti (Ch) sa skrobnim zrnima (sg); C – Citoplazmatični konac (ct) između dve vakuole (V), jedro (N) sa jedarcetom (n); D – Jedro (N) sa jedarcetom (n) u centralnom delu ćelije, vakuola (V), hloroplasti (Ch). **Tretman floretinom (E-L):** E – Ekstremno tanak i izuvijan ćelijski zid (cw); F – Veoma zadebljan ćelijski zid (cw); G – Nazubljen ćelijski zid (cw); H – Citoplazma ispunjena brojnim vezikulama; I–J – Vakuole (V) ispunjene vezikulama različitih veličina, koje podsećaju na autofagična tela (a); vakuola (V), traheja (Tr); K–L – Veće vezikule koje podsećaju na autofagozome (ap) i rezidualna tela nalik mijelinu (mb), kao i autofagična tela (a). Prikazane su reprezentativne mikrografije iz tri nezavisna eksperimenta. Bar: 2 μ m osim za (H), (J) i (L) – 1 μ m.

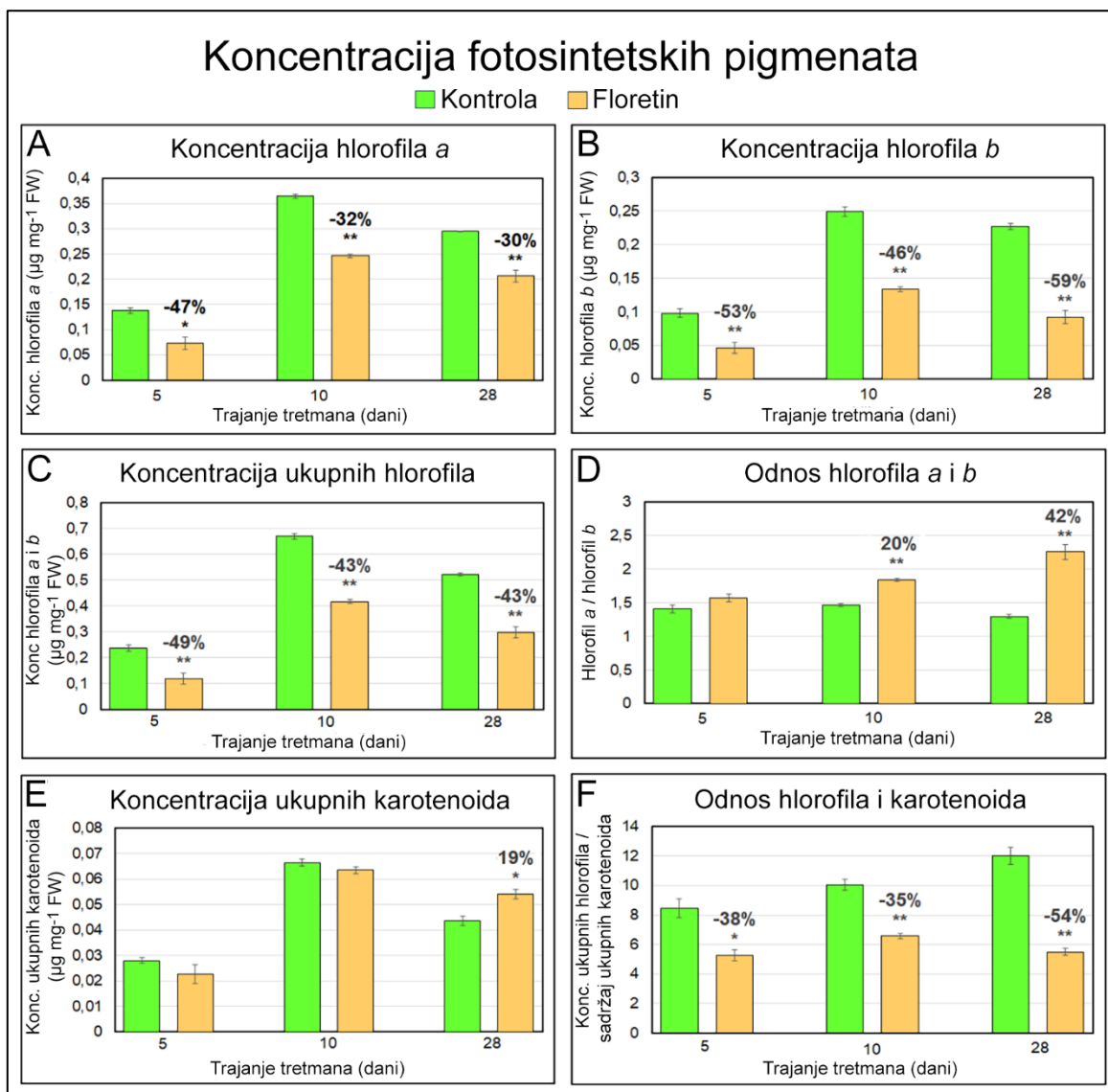
4.5. UTICAJ FLORETINA NA KONCENTRACIJU FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

Vizuelna pojava hloroze kod juvenilnih biljaka predstavlja jedan od najuočljivijih simptoma poremećaja u funkciji fotosintetskog aparata, i često je posledica strukturnih i biohemijskih promena unutar hloroplasta. Gubitak intenziteta zelene boje izdanaka može biti rezultat smanjenja koncentracije fotosintetskih pigmenata, prvenstveno hlorofila, čija količina i međusobni odnos neposredno odražavaju stanje i efikasnost fotosintetskog sistema. Promene na ultrastrukturnom nivou, poput dezorganizacije tilakoidnog sistema, dodatno upućuju na narušavanje integriteta hloroplasta i gubitak fotosintetskih pigmenata. Stoga, analiza promena u količini hlorofila i karotenoida, kao ključnih komponenti fotosintetskog i antioksidativnog sistema, pruža dragocene informacije o stepenu oštećenja fotosintetskog aparata i fiziološkim mehanizmima adaptacije biljke na stresne uslove.

Najizraženije smanjenje koncentracije hlorofila *a*, u iznosu od 47%, zapaženo je u izdancima juvenilnih biljaka nakon 5 dana tretmana 500 μ M floretinom, dok je sniženje količine ovog fotosintetskog pigmenta nakon 10 i 28 dana tretmana bilo nešto slabije izraženo nego kod petodnevnih juvenilnih biljaka i iznosilo u proseku oko 30% (**Slika 29A**). Sniženje koncentracije hlorofila *b* bilo je izraženije od smanjenja količine hlorofila *a* u svim posmatranim vremenskim tačkama (**Slika 29B**). Nasuprot hlorofilu *a*, čija je koncentracija bila u najvećoj meri snižena nakon pet dana tretmana, količina hlorofila *b* je najviše redukovana nakon produženog izlaganja floretinu u trajanju od 28 dana. U skladu sa dobijenim rezultatima, i smanjenje koncentracije ukupnih hlorofila bilo je statistički značajno i iznosilo je od 43 do 49%, u zavisnosti od trajanja tretmana (**Slika 29C**). Zapaženo povećanje vrednosti odnosa hlorofila *a* i *b* nakon 10 i 28 dana tretmana (**Slika 29D**) potvrđuje da je hlorofil *b* više osetljiv na tretman floretinom nego hlorofil *a*.

Na kraćim tretmanima floretinom (5 i 10 dana) nije bilo statistički značajnih promena koncentracije ukupnih karotenoida, dok se značajno povećanje javilo tek nakon 28 dana tretmana (19%) (**Slika 29E**). Odnos hlorofila i karotenoida bio je značajno smanjen u izdancima juvenilnih biljaka tretiranih floretinom u svim posmatranim vremenskim tačkama, pri čemu je sniženje u odnosu na kontrolu bilo veoma ujednačeno (38% nakon petog i 35% desetog dana) (**Slika 29F**). U skladu sa analizama koncentracije pojedinačnih pigmenata, smanjenje odnosa hlorofila i karotenoida bilo je najizraženije nakon 28 dana tretmana, što nedvosmisleno ukazuje na oštećenje fotosintetskog aparata ćelija i metabolizma fotosintetskih pigmenata izazvanih floretinom.

Smanjenje koncentracije hlorofila, naročito izraženo kod hlorofila *b* nakon produženog tretmana, u skladu je sa uočenim ultrastrukturnim oštećenjima hloroplasta i predstavlja osnovni fiziološki mehanizam koji dovodi do pojave hloroze listova. S obzirom na poznatu ulogu karotenoida kao neenzimske komponente antioksidativnog sistema kod biljaka, povećanje njihove koncentracije pri produženom tretmanu ukazuje na narušavanje integriteta fotosintetskog aparata i aktivaciju antioksidativnog odgovora.



Slika 29. Uticaj floretina na koncentraciju fotosintetskih pigmenata u izdancima juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Juvenilne biljke su gajene na $\frac{1}{2}$ MS hranljivim podlogama bez (kontrola) i sa 500 μ M floretinom u trajanju od 5, 10 i 28 dana. **A** – Koncentracija hlorofila *a*; **B** – Koncentracija hlorofila *b*; **C** – Koncentracija ukupnih hlorofila; **D** – Odnos hlorofila *a* i *b*; **E** – Koncentracija ukupnih karotenoida; **F** – Odnos hlorofila i karotenoida. Histogrami predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ standardne greške (SE) tri biološka ponavljanja (uzorci iz tri nezavisna eksperimenta). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike pri $*P < 0,05$ i $**P < 0,01$ na osnovu Studentovog *t*-testa, dok brojevi iznad stubića predstavljaju procenat povećanja (+)/smanjenja (-) koncentracije pigmenata u poređenju sa kontrolom. FW – sveža masa biljnog tkiva (eng. *fresh weight*). Konc. – koncentracija.

4.6. UTICAJ FLORETINA NA SADRŽAJ I DISTRIBUCIJU AUKSINA

S obzirom na to da je tretman floretinom izazvao dozno-zavisnu inhibiciju rastenja korena i izdanka, kao i niz morfoloških deformacija koje su povezane sa gubitkom normalnog gravitropskog odgovora (Poglavlje 4.1), radi utvrđivanja povezanosti ovih pojava sa poremećajem u homeostazi auksina kao ključnog endogenog faktora uključenog u regulaciju ovih procesa, sprovedena je analiza uticaja floretina na sadržaj i distribuciju auksina u juvenilnim biljkama *A. thaliana*. Još jedan razlog za ispitivanje auksina bile su očigledne sličnosti između efekta floretina na morfologiju klijanaca sa simptomima intoksikacije auksinskim herbicidima kao što je 2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4-D). Na osnovu ovih premisa, testirana je hipoteza o izmenjenoj homeostazi auksina kao jednom od osnovnih mehanizama delovanja floretina.

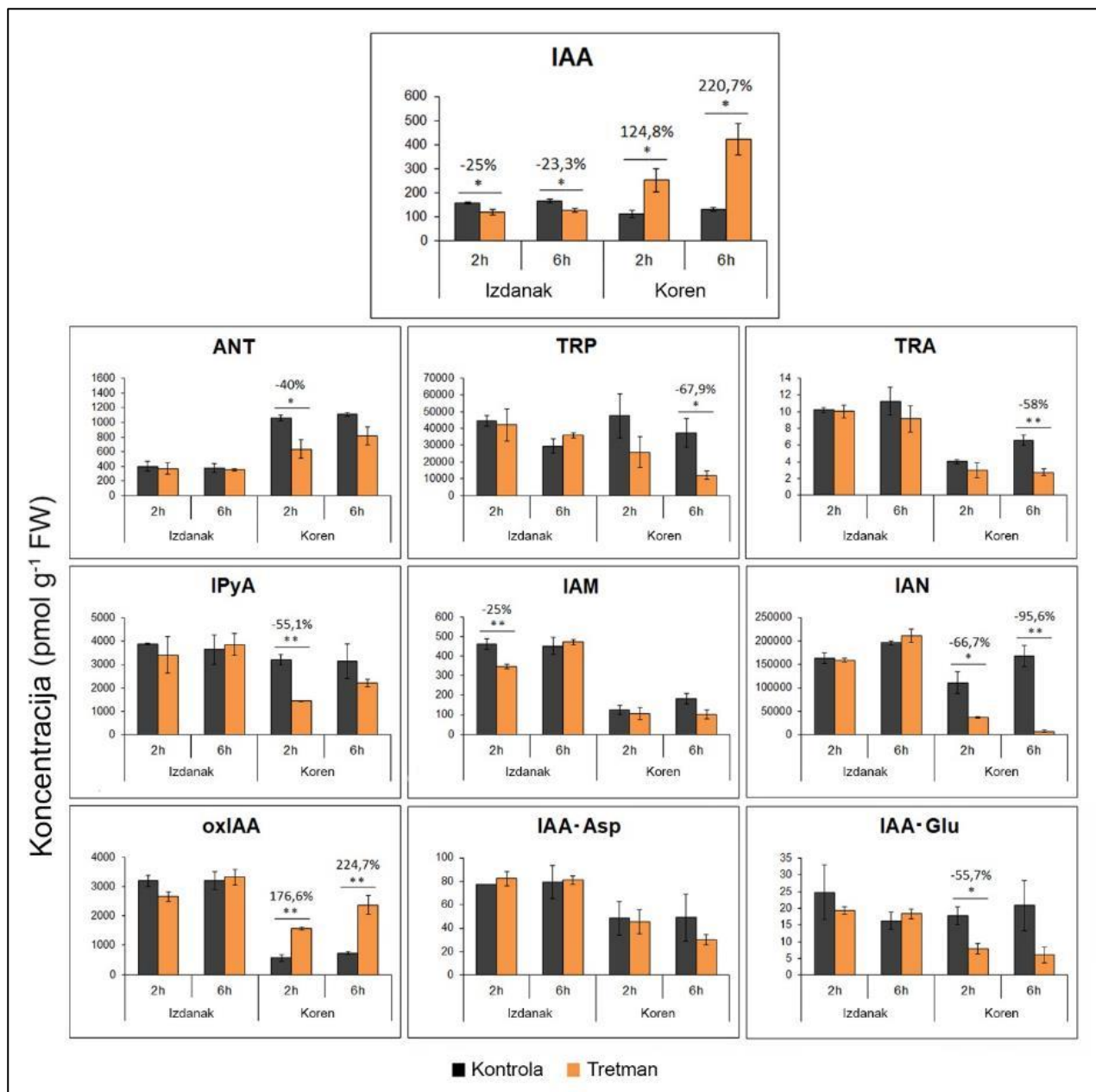
4.6.1. Uticaj floretina na sadržaj auksina i auksinskih metabolita

Primenom ultra-efikasne tečne hromatografije sa masenim detektorom (eng. *ultra high performance liquid chromatography with mass spectrometry*) (UHPLC–MS/MS), analiziran je sadržaj osnovnog oblika aktivnog auksina, indol-3-sirćetne kiseline (IAA), kao i devet ključnih auksinskih metabolita uključenih u puteve biosinteze, razgradnje i skladištenja IAA. Poznato je da su pomenuti putevi neophodni u procesu interkonverzije dostupnog auksina, ključnom za efikasno održavanje auksinske homeostaze u biljkama. Navedenom analizom pokazano je da već nakon dva sata od izlaganja tretmanu floretinom dolazi do značajnih promena u sadržaju IAA i njenih metabolita, pre svega u korenu, ali i u izdancima, što nedvosmisleno ukazuje na uticaj floretina na modulaciju metabolizma auksina (**Slika 30**).

Rezultati analize su pokazali da je homeostaza auksina u korenu tretiranih juvenilnih biljaka značajno narušena. Zapravo, sadržaj IAA u korenu naglo se povećao nakon izlaganja tretmanu floretinom, što je rezultiralo u dvostrukom, odnosno trostrukom povećanju njegovog sadržaja nakon dvočasovnog (124,8%) i šestočasovnog tretmana (220,7%) (**Slika 30**). Za razliku od korena, u izdancima je došlo do značajnog smanjenja sadržaja IAA nakon dvočasovnog (25%) i šestočasovnog tretmana (23,3%).

U istim vremenskim tačkama, sadržaj ključnih biosintetskih prekursora auksina: antranilata (ANT), triptofana (TRP), triptamina (TRA), indol-3-pirogroždane kiseline (IPyA) i indol-3-acetonitrila (IAN) u korenu bio je smanjen (**Slika 30**). Zapravo, nakon dvočasovnog tretmana floretinom, najpre je došlo do značajnog smanjenja sadržaja ANT (40%), da bi nakon šestočasovnog tretmana došlo do smanjenja sadržaja TRP za 67,9%. S obzirom da su ANT i TRP zajednički prekursori IAA u sva četiri biosintetska puta, njihov sadržaj bi mogao da ukaže na povećanu potrošnju ovih prekursorskih molekula usled povećane sinteze IAA. Sa druge strane, IAM, IAN, TRA i IPyA korespondiraju sa četiri glavna biosintetska puta IAA, pa njihov sadržaj direktno daje informaciju o aktivnosti ovih biosintetskih puteva. Smanjen sadržaj ANT i TRP, uz trostruko povećanu akumulaciju IAA u korenu, mogao bi da ukaže na to da floretin direktno utiče na stimulaciju biosinteze IAA bez obzira na biosintetski put koji je u biljci dominantan.

Sudeći na osnovu koncentracija IAN koje su bile mnogo veće u odnosu na druge prekursore kod kontrolnih juvenilnih biljaka (**Slika 30**), ovaj biosintetski put, karakterističan za rod *Brassica*, bio je najaktivniji u tretiranim juvenilnim biljkama *A. thaliana*. Očekivano, tretman floretinom najviše je stimulirao sintezu IAA preko IAN biosintetskog puta, smanjivši sadržaj ovog prekursora za 66,7% nakon 2 h, odnosno za 95,6% nakon 6 h tretmana.



Slika 30. Uticaj floretina na sadržaj indol-3-sirćetne kiseline (IAA) i njenih metabolita kod juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Sadržaj je određen u korenovima i izdancima petodnevnih juvenilnih biljaka *A. thaliana* nakon 2 h i 6 h od primene 500 μ M floretina. Kvantifikacija IAA, prekursora IAA (antranilata (ANT), triptofana (TRP), triptamina (TRA), indol-3-pirogroždane kiseline (IPyA), indol-3-acetamida (IAM), indol-3-acetonitrila (IAN)), intermedijera razgradnje IAA, 2-oksindol-3-sirćetne kiseline (oxIAA) i konjugata IAA (indol-3-acetilasparaginske kiseline (IAA-Asp) i indol-3-acetilglutaminske kiseline (IAA-Glu)). Histogrami predstavljaju srednje vrednosti sa standardnim greškama (SE) tri biološka ponavljanja (uzorci iz tri nezavisna eksperimenta). Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku pri $*P < 0,05$ i $**P < 0,01$ na osnovu Studentovog *t*-testa, dok brojevi iznad stubića označavaju procentualno povećanje (+) ili smanjenje (-) sadržaja metabolita auksina u poređenju sa kontrolom. FW – sveža masa biljnog tkiva (eng. *fresh weight*).

Nakon IAN, sledeći najzastupljeniji prekursor bila je IPyA. Njen sadržaj nije se značajno izmenio, izuzev na dvočasovnom tretmanu, pri čemu je došlo do smanjenja za 55,1%, nakon čega se koncentracija ovog jedinjenja vratila na normalu. Za razliku od ostalih prekursora, sadržaj IAM bio je značajno smanjen (25%) samo u izdancima, i to nakon dvočasovnog tretmana. Iako najmanje zastupljen kao prekursor, TRA je detektovan u sniženoj koncentraciji u korenu nakon šestočasovnog tretmana floretinom za 58% (**Slika 30**). Ovaj podatak dodatno potvrđuje učešće floretina u stimulaciji biosinteze IAA preko više različitih biosintetskih puteva, koji se nalaze u uzajamnoj dinamičkoj komunikaciji.

Sadržaj metabolita koji nastaju razgradnjom ili konjugacijom auksina sa aminokiselinama takođe je bio promenjen pod uticajem floretina. Sadržaj 2-oksindol-3-sirćetne kiseline (oxIAA), kao tipičnog pokazatelja katabolizma auksina, bio je dvostruko, odnosno trostruko uvećan u korenu, nakon 2 h i 6 h tretmana, i korespondirao je proporcionalno sa procentualnim povećanjem sadržaja IAA u istim vremenskim tačkama. Sa druge strane, sadržaj konjugata IAA sa aminokiselinama i to: indol-3-acetilasparaginske kiseline (IAA-Asp) i indol-3-acetilglutaminske kiseline (IAA-Glu) nije bio značajno promenjen nakon tretmana floretinom, osim kod IAA-Glu nakon dvočasovnog tretmana u korenu, pri čemu je sadržaj smanjen za 55,7% (**Slika 30**). Ipak, nakon šestočasovnog tretmana sadržaj konjugata IAA se izjednačio sa kontrolnim. Ovi konjugati IAA ključni su za proces održavanja homeostaze aktivnog auksina, jer služe istovremeno kao reverzibilni depoi IAA i kao intermedijeri degradacije koji mogu biti ireverzibilno oksidovani do oxIAA-Asp i oxIAA-Glu, a koji se dalje hidrolizuju do oxIAA. S obzirom na to da sadržaj konjugata IAA-Asp i IAA-Glu nije bio značajno promenjen ili je bio niži u odnosu na kontrolu, možemo pretpostaviti da je tretman floretinom indukovao intenzivnu razgradnju IAA do oxIAA brzom konverzijom IAA-Glu i IAA-Asp do njihovih oksidovanih formi i dalje do oxIAA.

Očigledno, intenzivna akumulacija IAA u korenovima juvenilnih biljaka, koja nastupa vrlo brzo nakon tretmana floretinom, aktivira kataboličke puteve auksina u cilju eliminacije njegove prekomerne količine i održanja auksinske homeostaze. Ipak, zabeleženo dvostruko, odnosno trostruko povećanje sadržaja ovog fitohormona ukazuje na narušavanje fine ravnoteže između sinteze, razgradnje, konjugacije, kao i polarnog transporta i distribucije aktivnog oblika auksina u korenu.

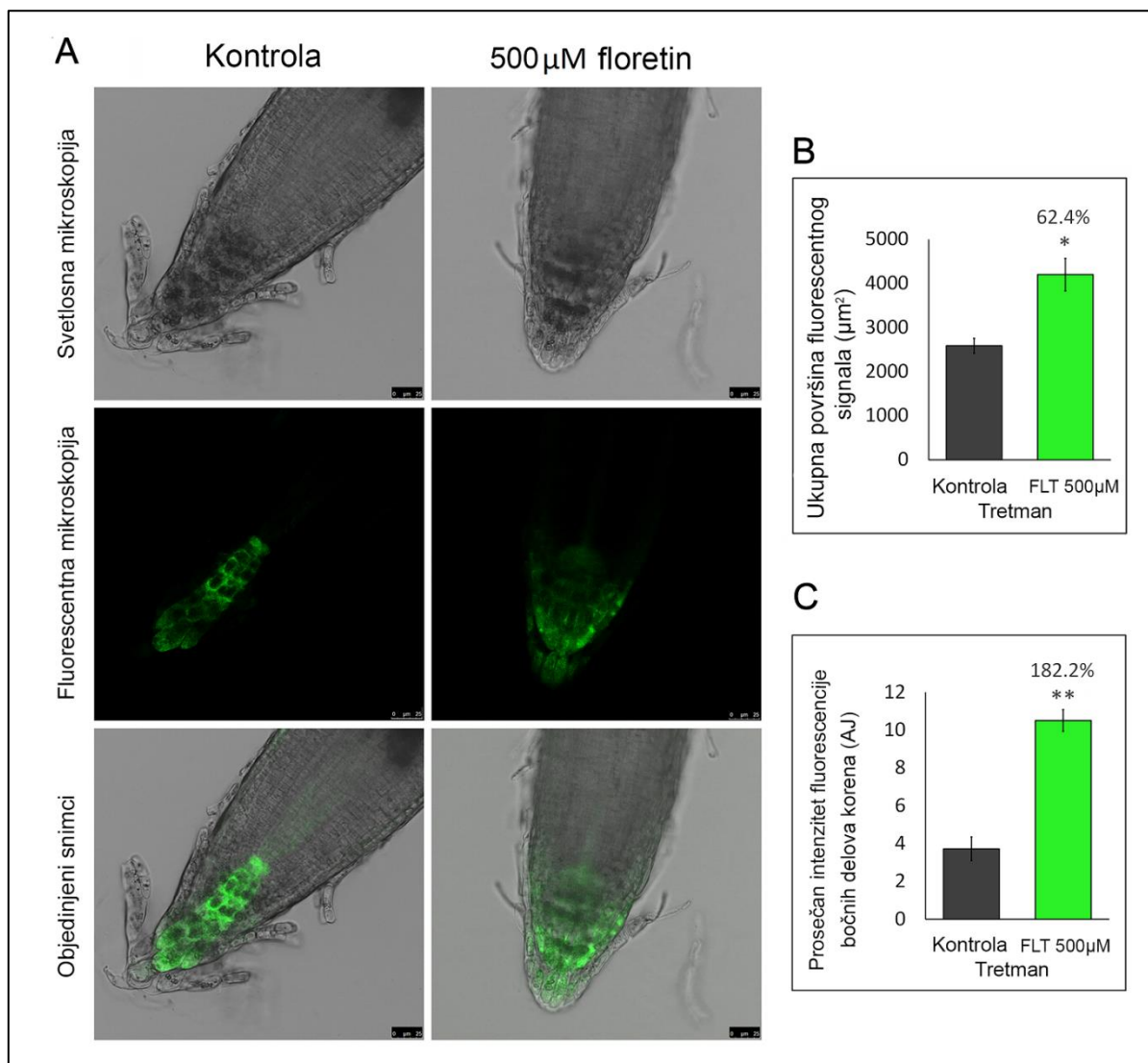
4.6.2. Uticaj floretina na distribuciju auksina u vrhovima korena

Budući da je tretman floretinom, pored izraženih morfoloških promena kod juvenilnih biljaka, prouzrokovao veoma značajno povećanje sadržaja aktivnog auksina u korenu, ukazala se potreba za analizom potencijalne redistribucije auksina u vršnim delovima primarnog korena. Za potrebe ovakve analize, korišćena je transgena linija *A. thaliana* koja eksprimira reporter DR5rev::GFP uz pomoć koga se može vizuelizovati i indirektno kvantifikovati prisustvo aktivnog auksina u vidu zelenog fluorescentnog signala (**Slika 31**).

Posmatranjem transgenih juvenilnih biljaka *A. thaliana* tretiranih 500 μ M floretinom utvrđene su značajne promene u intenzitetu i prostornoj distribuciji fluorescentnog signala u odnosu na juvenilne biljke koje nisu tretirane floretinom. Kod kontrolnih juvenilnih biljaka DR5rev::GFP linije, fluorescentni signal zabeležen je pretežno u ćelijama kolumele centralnog dela vrha korena sve do apikalnog meristema, formirajući jasno definisanu fluorescentnu oblast cilindričnog oblika (**Slika**

31A). Dodatno, minimalna ekspresija GFP signala primećena je u steli, a sporadično u ćelijama epidermisa i bočnim stranama korenove kape. Kod korenova tretiranih 500 μ M floretinom, fluorescentni signal bio je proširen na ceo region kolumele, kao i na bočne strane korenove kape, uključujući i pojedine ćelije epidermisa i korteksa vrha korena (**Slika 31A**). Time je ukupna površina fluorescentnog signala povećana za 62,4% u odnosu na površinu signala kod kontrolnih korenova (**Slika 31B**). Fluorescencija je bila posebno izražena na bočnim stranama vršnog dela korena gde je zabeležen signal bio skoro trostruko intenzivniji u poređenju sa kontrolom (**Slika 31C**). Dobijeni rezultati ukazali su na značajno izmenjenu distribuciju auksina i njegovu intenzivnu akumulaciju u bočnim delovima vrha korena, posebno u bočnim stranama korenove kape, epidermisu i ćelijama korteksa koje su glavni putevi bazipetalnog protoka auksina u korenu.

Uočen obrazac ukazuje na moguće poremećaje u regulaciji bazipetalnog transporta auksina, pri čemu izmenjena distribucija i povećan intenzitet fluorescentnog signala sugerišu da floretin može modulirati mehanizme polarne translokacije ovog fitohormona. Takva redistribucija može da naruši auksinsku homeostazu u meristemskom i elongacionom regionu, i poremeti normalne gradijente potrebne za koordinisanu ćelijsku deobu i elongaciju. Posledično, može doći do inhibicije rasteenja korena, poremećaja u organizaciji vršnog meristema i pojave morfoloških deformacija, pri čemu se efekti mogu dodatno pojačati aktivacijom negativnih povratnih mehanizama u auksinskoj signalizaciji. Ovi nalazi snažno podržavaju pretpostavku da prekomerna akumulacija aktivnog auksina u vršnim delovima korena ima izražen inhibitorni efekat na rasteenje, izduživanje i gravitropski odgovor juvenilnih biljaka usled narušavanja dinamičke homeostaze auksina.



Slika 31. Uticaj floretina na distribuciju auksina u vrhovima korena transgene linije DR5rev::GFP *A. thaliana*. Juvenilne biljke su gajene vertikalno u Petri-kutijama na $\frac{1}{2}$ MS hranljivim podlogama bez (kontrola) i sa 500 μ M floretinom u trajanju od 5 dana. **A** – Snimci vrha korena pod svetlosnim i fluorescentnim mikroskopom. Zelena fluorescentna boja ukazuje na prisustvo aktivnog auksina. Bar: 25 μ m; **B** – Kvantifikacija ukupne površine GFP fluorescentnog signala; **C** – Prosečan intenzitet GFP fluorescencije u bočnim delovima vrhova korena kontrolnih i tretiranih juvenilnih biljaka. Pod površinom bočnih delova podrazumeva se površina od vrha korena do apikalnog meristema, isključujući četiri kolone ćelija kolumele u centru vrha korena. Histogrami predstavljaju srednje vrednosti sa standardnim greškama (SE) šest ispitivanih juvenilnih biljaka iz dva nezavisna eksperimenta. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike pri * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ zasnovane na Studentovom t -testu, dok brojevi iznad stubića označavaju procentualno povećanje ukupne površine GFP fluorescentnog signala (B) ili srednjeg intenziteta fluorescencije (C) u poređenju sa kontrolom. AJ – arbitrarne jedinice; FLT – floretin.

4.7. UTICAJ FLORETINA NA ANTIOKSIDATIVNI STATUS JUVENILNIH BILJAKA

4.7.1. Uticaj floretina na neenzimske komponente antioksidativnog sistema

4.7.1.1. Efekat floretina na ukupnu antioksidativnu aktivnost i sadržaj fenolnih jedinjenja juvenilnih biljaka

Analiza ukupnog antioksidativnog potencijala i sadržaja fenolnih jedinjenja pruža uvid u sposobnost biljke da neutralizuje reaktivne kiseonične vrste (ROS) i ublaži oksidativni stres. Fenolna jedinjenja, kao značajna grupa sekundarnih metabolita, ispoljavaju snažna antioksidativna svojstva zahvaljujući mogućnosti doniranja vodonikovih atoma i heliranja metalnih jona. Utvrđivanje njihovog sadržaja, zajedno sa procenom ukupnog antioksidativnog potencijala, omogućava procenu efikasnosti endogenog zaštitnog sistema i potencijalne adaptacije na uslove stresa, kakav može biti tretman floretinom.

Spektrofotometrijska analiza ABTS pokazala je statistički veoma značajno ($P < 0,001$) povećanje ukupne antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata juvenilnih biljaka koje su bile izložene 500 μM floretinu u trajanju od 5 i 10 dana. Zabeleženo je skoro četverostruko, odnosno trostruko povećanje antioksidativne aktivnosti nakon 5, odnosno 10 dana tretmana floretinom u odnosu na kontrolne juvenilne biljke (**Slika 32A**). Detektovano povećanje ukazuje na značajan uticaj floretina na antioksidativni potencijal tretiranih juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Takvo povećanje bi se jednim delom moglo pripisati antioksidativnoj prirodi samog floretina, ali potencijalno i drugih fenolnih jedinjenja. U skladu sa tim, analiza sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u tretiranim juvenilnim biljkama ukazala je na više od dvostrukog povećanja ovih jedinjenja nakon 5 i 10 dana tretmana floretinom u poređenju sa netretiranim juvenilnim biljkama (**Slika 32B**). Ovi rezultati u velikoj meri korespondiraju sa podacima merenja antioksidativnog potencijala juvenilnih biljaka na tretmanu floretinom, što sugerise da povećan sadržaj fenolnih jedinjenja, uključujući sam floretin i/ili njegove derivate koji poseduju antioksidativnu aktivnost (Poglavlje 4.7.1.2) verovatno doprinosi značajnom povećanju antioksidativnog potencijala tretiranih juvenilnih biljaka.

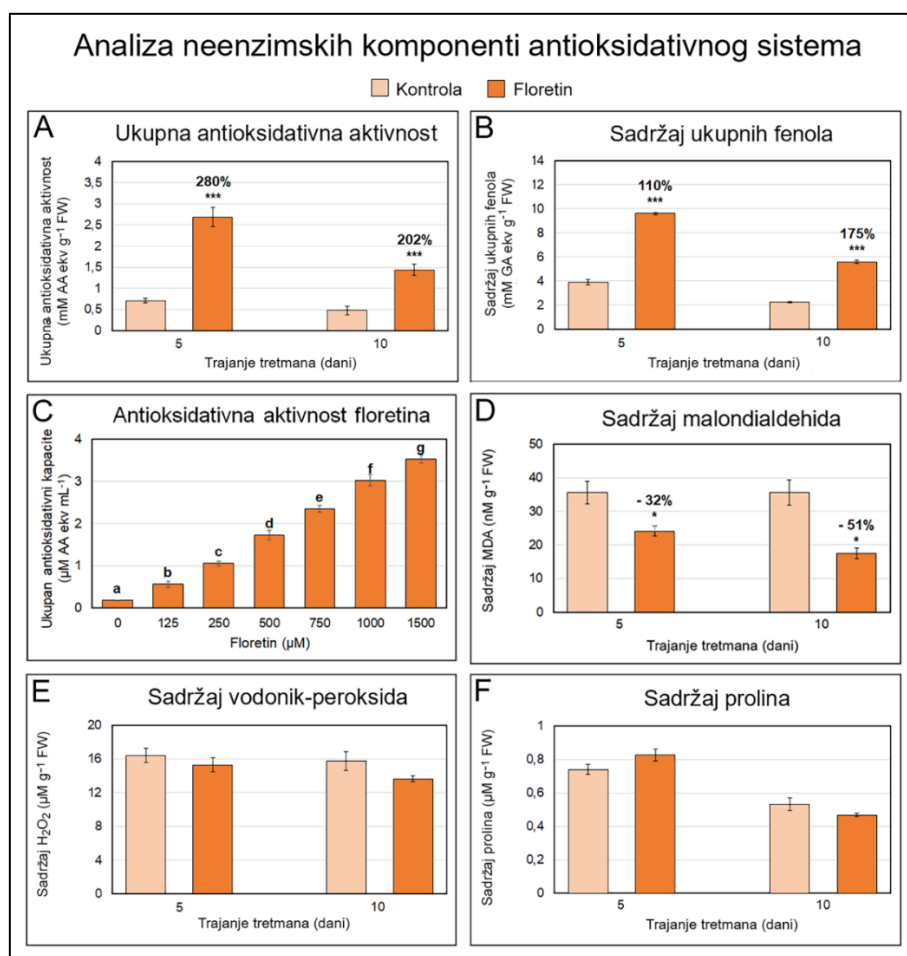
4.7.1.2. Antioksidativna aktivnost metanolnih rastvora floretina

U cilju potvrde literaturno dostupnih podataka o antioksidativnoj aktivnosti floretina, kao i pretpostavke o njegovom doprinosu ukupnom antioksidativnom potencijalu juvenilnih biljaka *A. thaliana* na tretmanu 500 μM floretinom, određena je antioksidativna aktivnost metanolnih rastvora floretina korišćenjem identičnog ABTS spektrofotometrijskog testa koji je korišćen i za određivanje antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata juvenilnih biljaka (Poglavlje 4.7.1.1). Rezultati analize antioksidativne aktivnosti metanolnih rastvora floretina u koncentracijama od 0 do 1500 μM ukazali su na veoma izraženu antioksidativnu aktivnost sa dozno-zavisnim obrascem (**Slika 32C**). Najizraženiju antioksidativnu aktivnost od 3,5 mM AA ekv mL^{-1} pokazala je najviša ispitivana koncentracija floretina od 1500 μM . Antioksidativna aktivnost 500 μM rastvora floretina iznosila je 1,7 mM AA ekv mL^{-1} (**Slika 32C**), što je znatno veće u poređenju sa vrednostima antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata juvenilnih biljaka *A. thaliana* tretiranim 500 μM floretinom

izraženim na isti način tj. kao mM AA mL⁻¹ ekstrakta (0,54 nakon 5 i 0,28 mM AA mL⁻¹ nakon 10 dana). Dobijeni rezultati mogu sugerisati da svojom antioksidativnom aktivnošću, usvojeni floretin ili derivati nastali njegovim metabolisanjem (Poglavlje 4.10), mogu doprineti ukupnom antioksidativnom potencijalu tretiranih juvenilnih biljaka.

4.7.1.3. Efekat floretina na sadržaj malondialdehida, vodonik-peroksida i prolina

Ispitivanje sadržaja malondialdehida (MDA), vodonik-peroksida (H₂O₂) i prolina predstavlja važan pristup za procenu intenziteta oksidativnog stresa u biljnim tkivima. Malondialdehid je produkt peroksidacije lipida i pouzdan marker oštećenja ćelijskih membrana, dok vodonik-peroksid, kao reaktivna kiseonična vrsta, učestvuje u oksidativnim oštećenjima, ali i u signalnim procesima.



Slika 32. Efekat floretina na neenzimske komponente antioksidativnog sistema juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Juvenilne biljke su gajene na ½MS hranljivim podlogama bez (kontrola) i sa 500 μM floretinom u trajanju od 5 i 10 dana. **A** – Ukupna antioksidativna aktivnost; **B** – Ukupan sadržaj fenola; **C** – Antioksidativna aktivnost floretina; **D** – Sadržaj malondialdehida; **E** – Sadržaj vodonik-peroksida; **F** – Sadržaj prolina. Histogrami predstavljaju srednju vrednost sa standardnim greškama (SE) tri biološka ponavljanja. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku pri **P* < 0,05 i ****P* < 0,001 na osnovu Studentovog *t*-testa, dok brojevi iznad stubića označavaju procentualno povećanje (+) ili smanjenje (-) vrednosti tretmana u odnosu na kontrolu. Slova iznad histograma na grafiku C predstavljaju rezultat Fišerovog testa najmanje značajne razlike (*P* < 0,05). FW – sveža masa biljnog tkiva (eng. *fresh weight*).

Prolin, s druge strane, deluje kao osmoprotektant i antioksidans, pomažući u stabilizaciji ćelijskih struktura i smanjenju štetnog delovanja slobodnih radikala. Analiza sadržaja ovih jedinjenja omogućava pouzdanu procenu stepena narušavanja redoks homeostaze i adaptivnih odgovora biljke na uslove stresa.

Dobijeni rezultati su pokazali da je sadržaj malondialdehida kod tretiranih juvenilnih biljaka bio smanjen za 32% nakon 5 dana tretmana i za 51% nakon 10 dana izlaganja floretinu (**Slika 32D**), što ukazuje na potencijalno smanjenu peroksidaciju lipida i manji nivo oksidativnog oštećenja. Sadržaj prolina i vodonik-peroksida ostao je uglavnom nepromenjen tokom ispitivanog perioda, iako je zabeležena tendencija opadanja, naročito nakon dužeg tretmana floretinom (**Slika 32E, F**). Zapravo, smanjenje sadržaja malondialdehida u odnosu na kontrolu može biti indikativno za zaštitnu ulogu tretmana, jer čak i neznatno smanjenje lipidne peroksidacije može doprineti očuvanju integriteta ćelijskih membrana. Tendencija smanjenja sadržaja vodonik-peroksida i prolina može ukazivati na umerenu modulaciju antioksidativnog odgovora biljke, što bi u kombinaciji sa drugim endogenim sistemima moglo doprineti ukupnoj otpornosti juvenilnih biljaka na oksidativni stres.

Ovi trendovi sugerišu da tretman floretinom ne izaziva oksidativni stres kod tretiranih juvenilnih biljaka, već naprotiv može doprineti stabilizaciji redoks homeostaze, smanjujući nakupljanje reaktivnih kiseoničnih vrsta, upravo zbog izraženog antioksidativnog potencijala, kako je i demonstrirano u prethodnom poglavlju (4.7.1.2).

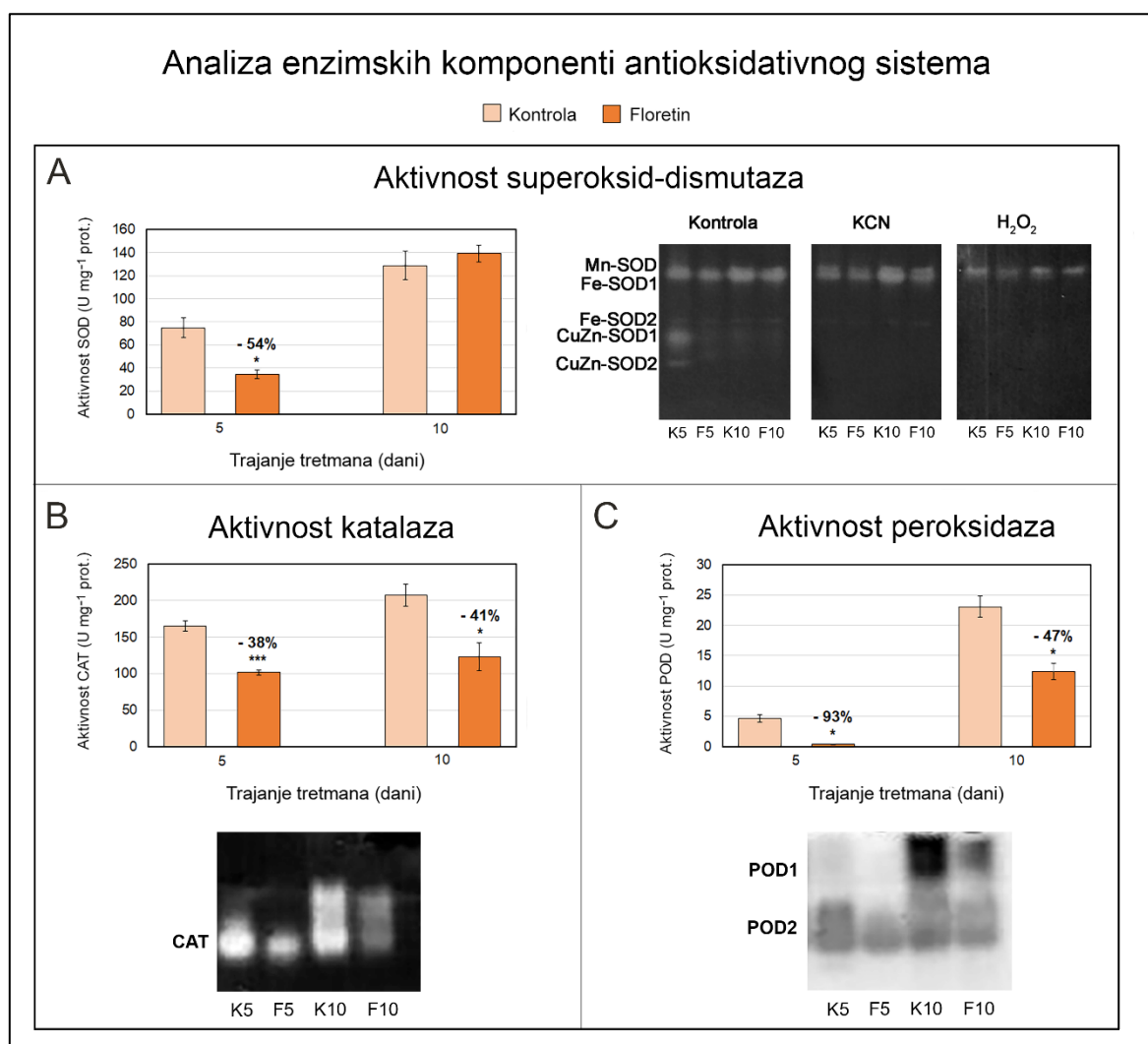
4.7.2. Uticaj floretina na enzimske komponente antioksidativnog sistema

Antioksidativni enzimi predstavljaju ključnu komponentu odbrambenog sistema biljaka protiv oksidativnog stresa, koji nastaje usled akumulacije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Njihova aktivnost često se koristi kao pouzdan bioindikator stepena stresa i adaptivnih odgovora biljaka, posebno u uslovima abiotičkog ili alelopatskog stresa. Praćenje aktivnosti ovih enzima predstavlja važan pokazatelj intenziteta oksidativnog stresa i sposobnosti biljke da održi homeostazu oksidativnog statusa. Međutim, smanjena aktivnost ovih enzima ne mora nužno značiti slabljenje odbrambenog sistema, već može odražavati i manju potrebu za enzimskom zaštitom usled efikasnog uklanjanja ROS drugim mehanizmima, uključujući prisustvo snažnih neenzimskih antioksidanasa.

Spektrofotometrijska merenja pokazala su da se aktivnost superoksid-dismutaza (SOD) smanjila za 54% nakon 5 dana tretmana floretinom u odnosu na kontrolu, dok je nakon 10 dana dostigla vrednosti slične kontroli (**Slika 33A**). Aktivnost katalaza (CAT) bila je smanjena za 38% nakon 5 dana i 41% nakon 10 dana, dok je aktivnost peroksidaza (POD) pokazala najizraženiji pad – čak 93% nakon 5 dana, uz delimičan oporavak na 47% ispod vrednosti kontrole nakon 10 dana (**Slika 33B, C**). Privremeni oporavak aktivnosti SOD nakon 10 dana može ukazivati na blagu adaptaciju biljaka na produženi tretman, ali bez značajnog porasta oksidativnog stresa. Kod kontrolnih biljaka primećen je postepeni porast aktivnosti svih ispitivanih enzima tokom eksperimentalnog perioda, što se može dovesti u vezu sa povećanjem oksidativnog stresa usled *in vitro* uslova gajenja.

Na zimogramu prikazanom na **slici 33A** detektovano je najviše pet izoformi SOD (1 Mn-SOD, 2 Fe-SOD i 2 CuZn-SOD), pri čemu je najveći broj SOD izoformi uočen u uzorku K5 (kontrola nakon 5 dana). Kod CAT je uočena jedna izoforma u svim uzorcima (**Slika 33B**), dok su kod POD

detektovane najviše dve izoforme, koje su uočene u uzorcima K10 (kontrola nakon 10 dana) i F10 (tretman floretinom nakon 10 dana) (**Slika 33C**).



Slika 33. Efekat floretina na aktivnost antioksidativnih enzima kod biljaka *A. thaliana*. Juvenilne biljke su gajene na ½MS hranljivim podlogama bez floretina (kontrola) i sa 500 µM floretinom u trajanju od 5 i 10 dana. Aktivnost enzima je određena spektrofotometrijskom analizom i analizom na poliakrilamidnim gelovima nakon razdvajanja ukupnih proteina nativnom gel-elektroforezom uz adekvatno bojenje. **A** – Spektrofotometrijsko i elektroforetsko određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza; **B** – Spektrofotometrijsko i elektroforetsko određivanje aktivnosti katalaza; **C** – Spektrofotometrijsko i elektroforetsko određivanje aktivnosti peroksidaza. Histogrami na graphicima predstavljaju srednje vrednosti aktivnosti sa standardnim greškama (SE) iz tri biološka ponavljanja. Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku pri * $P < 0,05$ i *** $P < 0,001$ na osnovu Studentovog t -testa, dok brojevi iznad stubića označavaju procentualno povećanje (+) ili smanjenje (-) aktivnosti kod tretmana floretinom (500 µM) u odnosu na kontrolu. Oznake ispod zimograma označavaju uzorke biljnog tkiva: K5 – kontrola nakon 5 dana; F5 – tretman floretinom nakon 5 dana; K10 – kontrola nakon 10 dana; F10 – tretman floretinom nakon 10 dana; CAT – katalaza; POD1, POD2 – izoforme proksidaze rena; SOD – superoksid-dismutaza. Za identifikaciju specifičnih izoformi superoksid-dismutaza korišćeni su selektivni inhibitori: H₂O₂ (5 mM) koji inhibira izoforme CuZn- i Fe-SOD, kao i KCN (1 mM) koji inhibira izoforme CuZn-SOD.

Smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima u prisustvu floretina ne ukazuje nužno na narušavanje antioksidativne zaštite, već naprotiv, može ukazivati na manju potrebu za uključivanjem enzimske komponente antioksidativnog sistema usled snažnog neutralisanja ROS neenzimskim

sistemom. Na osnovu prethodne analize neenzimske komponente antioksidativnog sistema, koja je pokazala veoma značajan porast sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti juvenilnih biljaka na tretmanu floretinom (Poglavlje 4.7.1.1), možemo pretpostaviti da je usled smanjenog oksidativnog stresa, potreba za visokom aktivnošću SOD, CAT i POD značajno smanjena, što se i odražava kroz zabeležene niže vrednosti aktivnosti ovih enzima. Alternativno, smanjena aktivnost ovih enzima može biti posledica njihove direktne inhibicije od strane floretina, što predstavlja tematiku koja je razmatrana u narednom poglavlju (4.8). Rezultati potvrđuju da morfološke, citohistološke i druge promene zabeležene tokom kratkotrajnog tretmana floretinom nisu posledica oksidativnog stresa.

4.8. ANALIZA EFEKTA FLORETINA NA INHIBICIJU ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE I PEROKSIDAZE

Značajno smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima u juvenilnim biljkama *A. thaliana* nakon tretmana floretinom predstavljalo je osnovu za postavku pretpostavke o postojanju direktne interakcije floretina sa molekulima antioksidativnih enzima, pre svega katalaze i peroksidaze. U cilju provere ove pretpostavke i razjašnjenja molekularne osnove i dinamike interakcije floretin-enzim, primenjen je integrativni analitički pristup koji je obuhvatio *in vitro* kinetičku analizu sa ciljem određivanja tipa i mehanizma inhibicije, kao i *in silico* analizu enzimske inhibicije zasnovanu na molekularnom dokingu i simulacijama molekulske dinamike.

4.8.1. *In vitro* analiza enzimske inhibicije katalaze i peroksidaze

In vitro kinetička analiza sprovedena je na odabranim komercijalno dostupnim i visoko prečišćenim enzimima: katalazi iz goveđe jetre (eng. *catalase from bovine liver*, CAT) i peroksidazi iz rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) u prisustvu floretina kao potencijalnog inhibitora.

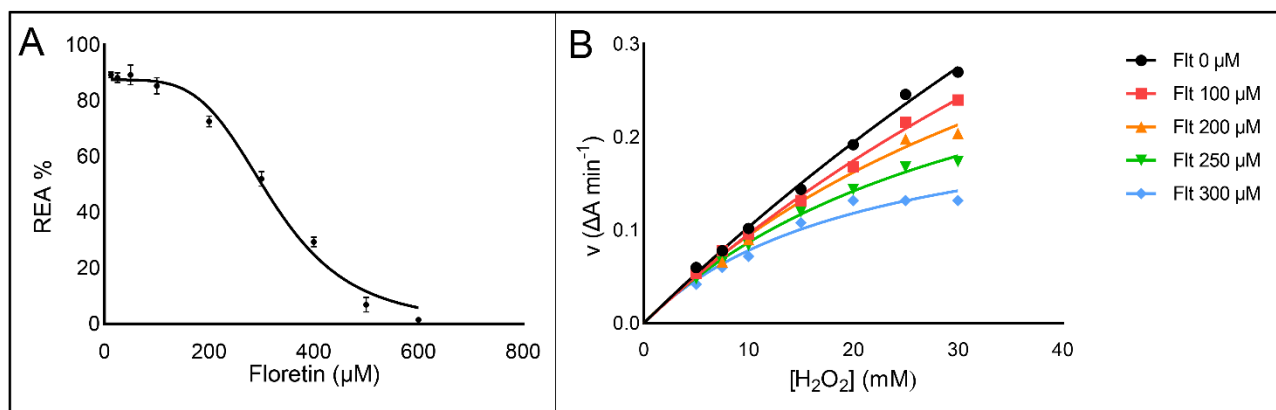
4.8.1.1. *Izbor rastvarača*

U cilju odabira rastvarača za pripremu matičnog rastvora floretina koji minimalno interferira sa korišćenim spektrofotometrijskim esejima i u najmanjoj meri remeti dinamiku katalitičkih reakcija, ispitan je efekat DMSO, 96% etanola, apsolutnog etanola i metanola na aktivnost odabranih enzima. Zapaženo je da DMSO uzrokuje znatan porast izmerenih vrednosti apsorbance, dok metanol inhibira enzimsku aktivnost. Apsolutni etanol se pokazao kao optimalan rastvarač, jer je ispoljio minimalan uticaj na aktivnost CAT i HRP, te je korišćen u daljim analizama.

4.8.1.2. Analiza enzimске inhibicije katalaze u prisustvu floretina

Na osnovu spektrofotometrijske analize enzimске aktivnosti katalaze u prisustvu rastućih koncentracija floretina, najpre su izračunate vrednosti preostale enzimске aktivnosti (eng. *residual enzyme activity*, REA) nakon delovanja floretina. Konstruisan je grafik koji je podešen (fitovan) jednačinom nelinearne regresije u programu *GraphPad Prism* (Slika 34A). Tom prilikom procenjena je srednja inhibitorna koncentracija floretina ($IC_{50} = 322,2 \mu M$) za katalazu pri konstantnoj koncentraciji supstrata – H_2O_2 (10 mM) i korišćena je za odabir opsega koncentracija floretina u daljoj analizi enzimске kinetike.

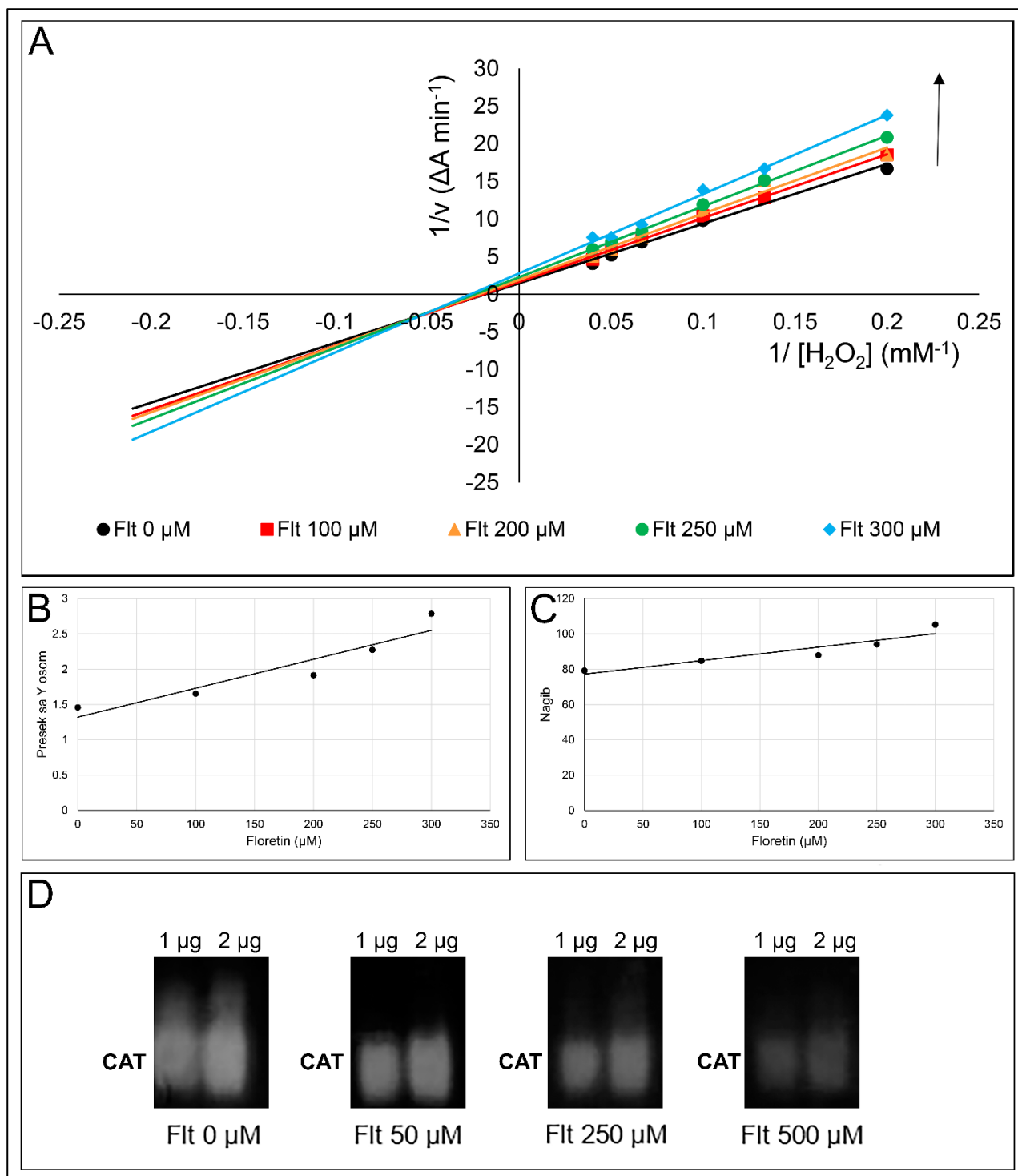
Michaelis–Mentenovim dijagramom (Slika 34B) prikazana je zavisnost brzine enzimске reakcije (v) od koncentracije H_2O_2 u prisustvu rastućih koncentracija floretina (0, 100, 200, 250 i 300 μM). Uočeno je da je prisustvo floretina izazvalo dozno-zavisno smanjenje brzine enzimске reakcije u poređenju sa reakcijom bez floretina. Razlike između kontrolnih i inhibiranih reakcija bile su manje izražene pri nižim koncentracijama H_2O_2 , dok su postajale sve izraženije sa njihovim porastom. Ovakav trend ukazuje na to da floretin utiče na enzimski sistem u celokupnom opsegu koncentracija supstrata, sa naročito izraženim inhibitornim efektom pri višim brzinama reakcije.



Slika 34. Analize enzimске aktivnosti katalaze iz goveđe jetre (eng. *catalase from bovine liver*, CAT) u prisustvu rastućih koncentracija floretina. **A** – Zavisnost preostale enzimске aktivnosti (eng. *residual enzyme activity*, REA) katalaze od koncentracije floretina. **B** – Michaelis–Mentenov dijagram zavisnosti brzine enzimске reakcije (v) katalaze od koncentracije supstrata, vodonik-peroksida (H_2O_2), u odsustvu i u prisustvu floretina. Linije predstavljaju nelinearni fit Michaelis–Mentenove jednačine korišćen za određivanje kinetičkih parametara K_m i V_{max} .

Nelinearno fitovanje Michaelis–Mentenovog modela ukazalo je da se sa povećanjem koncentracije floretina, maksimalna brzina enzimске reakcije (V_{max}) i Michaelisova konstanta (K_m) smanjuju (Tabela 8), što je ukazivalo na mešoviti tip inhibicije (eng. *mixed-type inhibition*) sa dominantnom nekompetitivnom komponentom.

U cilju vizuelne interpretacije i uporedne analize inhibitornog efekta različitih koncentracija floretina, konstruisan je Lineweaver–Burk dijagram (Slika 35A) koji predstavlja linearni prikaz recipročne vrednosti brzine enzimске reakcije ($1/v$) u funkciji recipročnih koncentracija supstrata ($1/[H_2O_2]$). Preseci konstruisanih pravih sa koordinatnim osama direktno ukazuju na vrednosti V_{max} i K_m , dok promena nagiba ili preseka u prisustvu inhibitora odražava izmene u kinetičkim parametrima.



Slika 35. A – Lineweaver–Burk dijagram ($1/v$ prema $1/[H_2O_2]$) za enzimsku aktivnost katalaze iz goveđe jetre (eng. *catalase from bovine liver*, CAT) u odsustvu i prisustvu rastućih koncentracija inhibitora (floreтина). **B** – Sekundarni plot zavisnosti preseka Lineweaver–Burk pravih sa Y-osom u funkciji koncentracije floretina; **C** – Sekundarni plot zavisnosti nagiba Lineweaver–Burk pravih od koncentracije floretina. **D** – Određivanje aktivnosti CAT primenom nativne gel-elektroforeze uz adekvatno bojenje: reprezentativni zimogrami sa uzorcima CAT (1 i 2 μg) tretiranih rastućim koncentracijama floretina (0, 50, 250 i 500 μM).

Na osnovu dvostruko–recipročne Lineweaver–Burk analize, potvrđeno je da se floretin ponaša kao inhibitor katalitičke aktivnosti katalaze. Uočeno je istovremeno smanjenje V_{max} i K_m vrednosti u prisustvu floretina, što ukazuje na smanjenu maksimalnu brzinu reakcije uz povećan

prividni afinitet enzima prema supstratu. Presecanje pravih u trećem kvadrantu Lineweaver–Burk dijagrama sugerisalo je mešoviti karakter inhibicije sa izraženom nekompetitivnom komponentom.

Kinetička analiza inhibicije katalazne aktivnosti floretinom sprovedena primenom nelinearne regresije Michaelis–Mentenove jednačine, dodatno je potvrdila utvrđeni tip inhibicije. Dobijene vrednosti konstante inhibicije za slobodan enzim ($K_i = 42\,949\ \mu\text{M}$) i enzim–supstrat kompleks ($K_i' = 63,47862\ \mu\text{M}$), kao i faktora alfa ($\alpha = 0,001478$) ukazale su na izraženu razliku u afinitetu floretina prema slobodnom enzimu i kompleksu enzim–supstrat.

Tabela 8. Vrednosti kinetičkih parametara za inhibiciju katalaze iz goveđe jetre (eng. *catalase from bovine liver*, CAT) u prisustvu floretina (Flt). U tabeli su prikazane vrednosti za $V_{\max}$ i K_m . Konstante inhibicije, koje su određene nelinearnom regresijom, bile su iste pri svim koncentracijama floretina ($K_i = 42\,949\ \mu\text{M}$; $K_i' = 63,47862\ \mu\text{M}$; $\alpha = 0,001478$).

	0 μM Flt	100 μM Flt	200 μM Flt	250 μM Flt	300 μM Flt
$V_{\max}$ ($\Delta\text{A min}^{-1}$)	1,636	1,004	0,5789	0,3892	0,2418
K_m (mM)	148,6	95,07	51,46	34,88	20,95

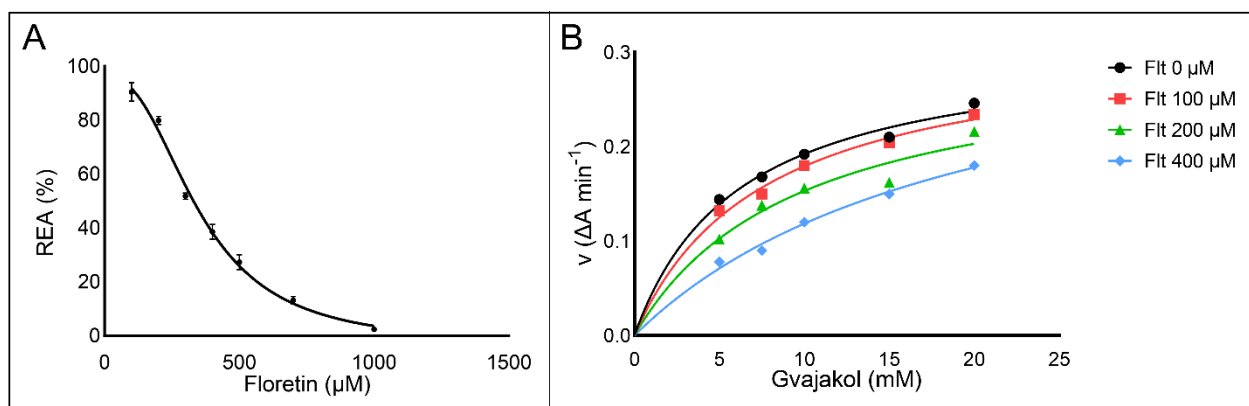
Visoka vrednost K_i sugerisala je da floretin pokazuje relativno slab afinitet prema slobodnom enzimu, dok je izrazito niska vrednost α (<1) ukazala na dominantnu interakciju inhibitora sa kompleksom enzim–supstrat, što je potvrđeno odnosom konstanti inhibicije $K_i \gg K_i'$. Ovakav odnos kinetičkih parametara objašnjava dozno-zavisno smanjenje brzine reakcije u prisustvu floretina, naročito pri višim koncentracijama supstrata, gde je formiranje kompleksa enzim–supstrat izraženije. Kombinacija visoke K_i vrednosti i izrazito niske vrednosti α , ukazuje na to da floretin stabilizuje kompleks enzim–supstrat u neproduktivnom obliku, čime se smanjuje maksimalna brzina reakcije.

Konstrukcija sekundarnih plotova zavisnosti preseka Lineweaver–Burk pravih sa Y-osom ili nagiba pravih u funkciji koncentracije inhibitora, omogućila je razlikovanje potpuno mešovite od parcijalno mešovite inhibicije. Dobijeni sekundarni plotovi (**Slika 35B i C**) blago odstupaju od linearne zavisnosti, što ukazuje na to da prisustvo inhibitora ne dovodi do potpune eliminacije enzimске aktivnosti, čak ni pri visokim koncentracijama inhibitora, već da enzim zadržava deo aktivnosti. Ovi rezultati ukazuju na parcijalni mešoviti tip inhibicije sa izraženom nekompetitivnom komponentom.

Primenom nativne gel-elektroforeze vizuelno je potvrđeno dozno-zavisno inhibitorno delovanje floretina na aktivnost katalaze iz goveđe jetre (**Slika 35D**).

4.8.1.3. Analiza enzimске inhibicije peroksidaze u prisustvu floretina

U cilju analize enzimске aktivnosti peroksidaze rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) u prisustvu floretina, najpre je konstruisan dijagram zavisnosti preostale enzimске aktivnosti (eng. *residual enzyme activity*, REA) u funkciji koncentracije floretina pri konstantnoj koncentraciji supstrata – gvajakola (20 mM) (**Slika 36A**). Korišćenjem programa *GraphPad Prism* procenjeno je da koncentracija floretina od 342,8 μM odgovara IC_{50} vrednosti, te je ona korišćena za odabir koncentracija floretina u daljoj analizi enzimске kinetike peroksidaze rena.



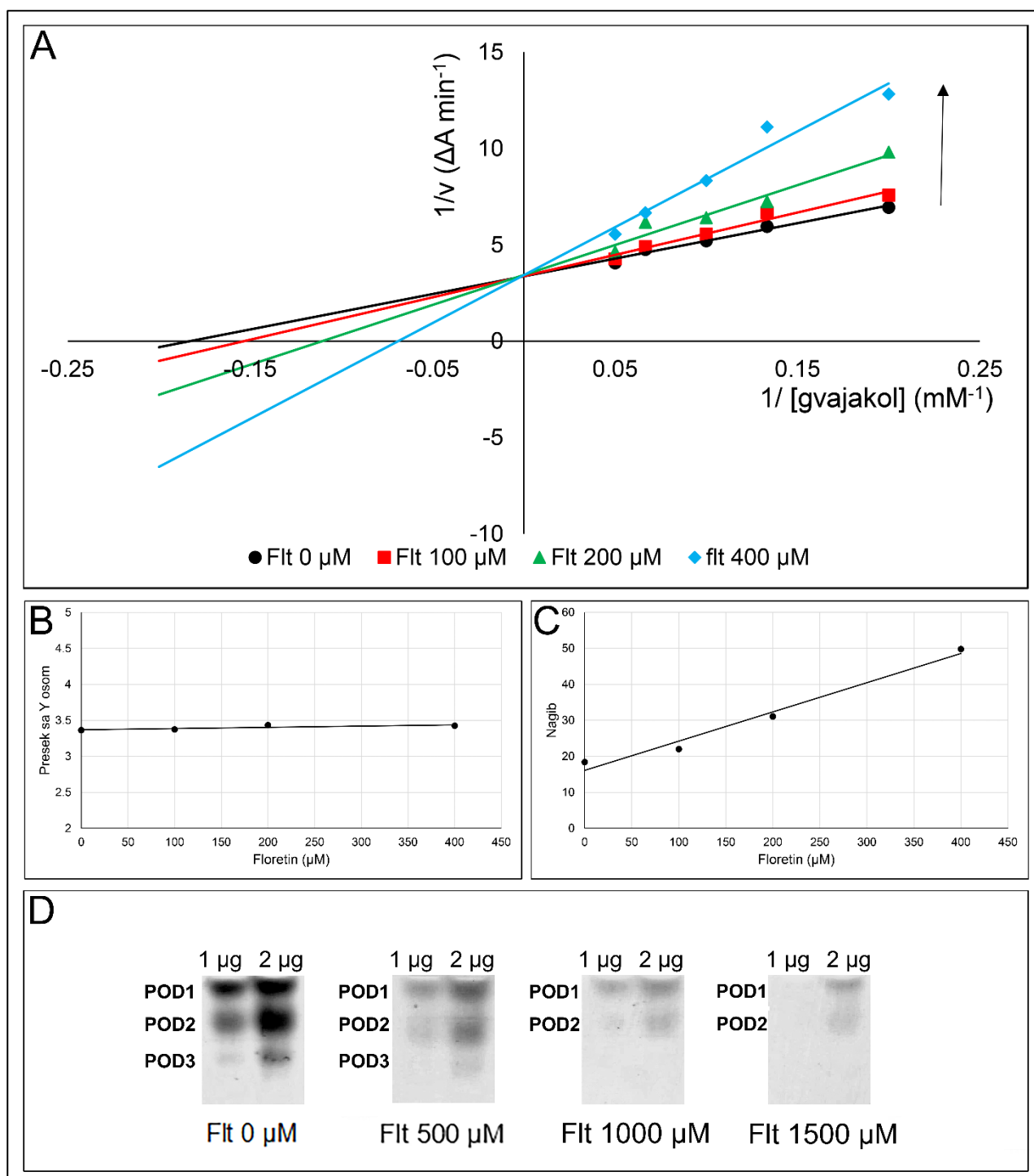
Slika 36. Analize enzimske aktivnosti peroksidaze rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) u prisustvu rastućih koncentracija floretina. **A** – Zavisnost preostale enzimske aktivnosti (eng. *residual enzyme activity*, REA) peroksidaze rena od koncentracije floretina. **B** – Michaelis–Mentenov dijagram zavisnosti brzine enzimske reakcije (v) peroksidaze rena od koncentracije supstrata – gvajakola u odsustvu i u prisustvu floretina. Linije predstavljaju nelinearni fit Michaelis–Mentenove jednačine korišćen za određivanje kinetičkih parametara K_m i V_{max} .

Uticaj floretina na aktivnost peroksidaze rena ispitan je merenjem početnih brzina reakcije pri različitim koncentracijama supstrata gvajakola u prisustvu rastućih koncentracija floretina (0, 100, 200 i 400 μM).

Michaelis–Mentenov dijagram (**Slika 36B**) pokazao je da se u prisustvu floretina brzina reakcije smanjuje u odnosu na reakciju bez inhibitora, pri čemu je efekat inhibicije izraženiji pri nižim koncentracijama supstrata, dok se pri višim koncentracijama gvajakola razlike između krivih smanjuju.

Nelinearno fitovanje Michaelis–Mentenovog modela ukazalo je da se sa povećanjem koncentracije floretina Michaelisova konstanta (K_m) povećava, dok vrednosti maksimalne brzine reakcije (V_{max}) ostaju približno konstantne (**Tabela 9**). Ovakav trend je karakterističan za kompetitivni tip inhibicije, kod kojeg inhibitor utiče isključivo na vezivanje supstrata za enzim, ali ne menja maksimalnu katalitičku brzinu enzima.

Dvostruko-recipročnim prikazom na Lineweaver–Burk dijagramu (**Slika 37A**) izvršen je detaljan uvid u prirodu enzimske inhibicije i dodatno potvrđen ovakav obrazac. Regresione prave dobijene pri različitim koncentracijama floretina seku se u približno istoj tački na Y-osi, što je ukazalo na nepromenjenu vrednost maksimalne brzine reakcije (**Tabela 9**). Istovremeno, sa porastom koncentracije floretina došlo je do povećanja nagiba pravih i pomeranja preseka sa X-osom ka manje negativnim vrednostima, što odražava porast vrednosti K_m (**Tabela 9**). Stoga se dobijeni rezultati mogu tumačiti u skladu sa modelom kompetitivne inhibicije, koji pretpostavlja da se vezivanjem floretina za enzim smanjuje broj slobodnih mesta na enzimu na kojima supstrat može da se veže, čime se smanjuje afinitet enzima prema supstratu i povećava K_m vrednost.



Slika 37. A – Lineweaver–Burk dijagram ($1/v$ prema $1/[gvajakol]$) peroksidaze rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) u odsustvu i prisustvu rastućih koncentracija inhibitora (floreтина). **B** – Sekundarni plot zavisnosti preseka Lineweaver–Burk pravih sa Y-osom u funkciji koncentracije floreтина; **C** – Sekundarni plot zavisnosti nagiba Lineweaver–Burk pravih od koncentracije floreтина. **D** – Određivanje aktivnosti HRP primenom nativne gel-elektroforeze i adekvatnog bojenja: reprezentivni zimogrami sa uzorcima HRP (1 i 2 μg) tretiranim rastućim koncentracijama floreтина (0, 500, 1000 i 1500 μM). ΔA – promena apsorbance; Flt – floretin; POD1, POD2, POD3 – izoforme proksidaze rena.

Konstanta inhibicije (K_i) za floretin određena je nelinearnim fitovanjem kinetičkih podataka korišćenjem modela kompetitivne inhibicije u programu *GraphPad Prism*. Dobijena vrednost K_i iznosi 255,2 μM , što ukazuje na umeren afinitet inhibitora prema enzimu. Parametar alfa (α), koji

opisuje relativni afinitet inhibitora prema kompleksu enzim–supstrat u odnosu na slobodan enzim, ima izuzetno visoku vrednost ($\alpha = 2,71 \times 10^{120}$). Tako visoka vrednost α ukazuje da je vezivanje inhibitora za enzim–supstrat kompleks kinetički zanemarljivo, odnosno da inhibitor praktično ne interaguje sa ovim kompleksom. U tom slučaju, konstanta inhibicije za kompleks enzim–supstrat ($K_i' = 6,91 \times 10^{122} \mu\text{M}$) postaje izuzetno velika. Ovakav odnos između K_i , α i K_i' predstavlja karakterističan obrazac čiste kompetitivne inhibicije, pri čemu inhibitor ostvaruje efekat isključivo putem kompeticije sa supstratom za vezivanje za slobodan enzim.

Tabela 9. Vrednosti kinetičkih parametara za inhibiciju komercijalne peroksidaze u prisustvu floretina (Flt). U tabeli su prikazane vrednosti $V_{\max}$ i K_m , dok su konstante inhibicije, , pri svim koncentracijama floretina bile konstantne ($K_i = 255,2 \mu\text{M}$; $K_i' = 6,91 \times 10^{122} \mu\text{M}$; $\alpha = 2,71 \times 10^{120}$).

	0 μM Flt	100 μM Flt	200 μM Flt	400 μM Flt
$V_{\max} (\Delta\text{A min}^{-1})$	0,3111	0,3164	0,3014	0,3572
$K_m (\text{mM})$	6,189	7,65	9,687	20,15

Dodatna potvrda kompetitivne inhibicije dobijena je analizom sekundarnih plotova izvedenih iz Lineweaver–Burk dijagrama. Zavisnost preseka pravih sa Y-osom ($1/V_{\max}$) od koncentracije floretina pokazuje gotovo horizontalnu liniju, što ukazuje da se vrednost $1/V_{\max}$ ne menja sa porastom koncentracije inhibitora. Ovakav rezultat potvrđuje da maksimalna brzina reakcije ostaje praktično nepromenjena u prisustvu floretina. Nasuprot tome, sekundarni plot nagiba Lineweaver–Burk pravih u funkciji koncentracije inhibitora pokazuje linearnu rastuću zavisnost, što jasno ukazuje na progresivno povećanje vrednosti K_m , odnosno smanjenje afiniteta enzima prema supstratu u prisustvu floretina.

Kombinacija gotovo konstantnih vrednosti $1/V_{\max}$ i linearne zavisnosti nagiba od koncentracije inhibitora predstavlja karakterističan kinetički obrazac kompetitivne inhibicije. Ovi nalazi su u potpunoj saglasnosti sa rezultatima dobijenim iz Michaelis–Menten i Lineweaver–Burk dijagrama i dodatno potvrđuju da floretin deluje kao kompetitivni inhibitor peroksidaze rena.

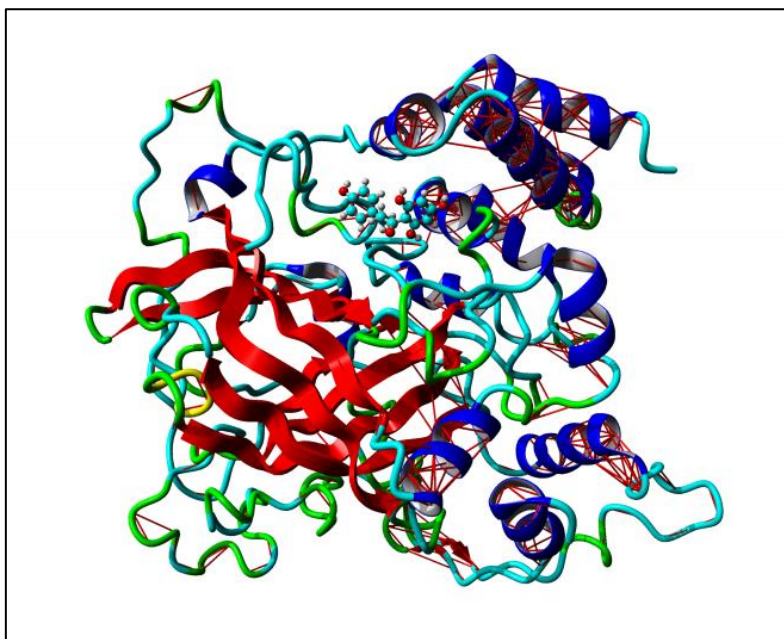
Primenom nativne gel-elektroforeze vizuelno je potvrđeno dozno-zavisno inhibitorno delovanje floretina na aktivnost peroksidaze rena (**Slika 37D**).

4.8.2. *In silico* analize interakcija floretina sa katalazom i peroksidazom

4.8.2.1. Analiza molekulskog dokinga

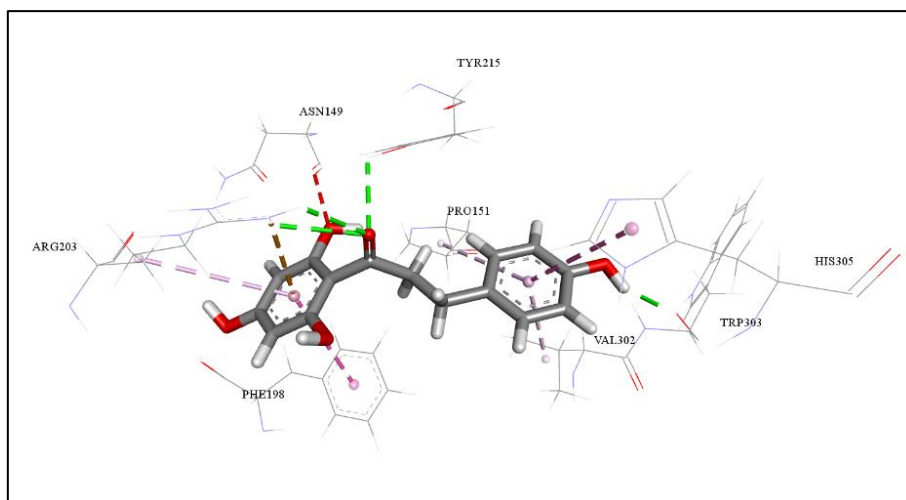
4.8.2.1.1. Interakcija floretina sa katalazom

U slučaju katalaze (PDB: 7VD9), blind doking analiza pokazala je da floretin ima najveći afinitet prema regionu koji se nalazi van katalitičkog centra, a koji je povezan sa vezivanjem molekula NADP(H) (**Slika 38**). Energija vezivanja za ovaj kompleks iznosila je $-7,708 \text{ kcal mol}^{-1}$, što ukazuje na stabilnu interakciju floretina sa enzimom. Ključne interakcije za stabilizaciju kompleksa enzim–floretin su standardne vodonične veze sa Arg 203 i Tyr 215 aminokiselinskim ostacima enzima (**Slika 39**).



Slika 38. Energetski najpovoljnije mesto vezivanja floretina na katalazi. Molekul floretina prikazan je u gornjoj polovini slike, u vidu strukture sa atomima tirkizne i crvene boje. Struktura katalaze generisana je u programu Yasara (YASARA Biosciences GmbH, Wien, Austrija).

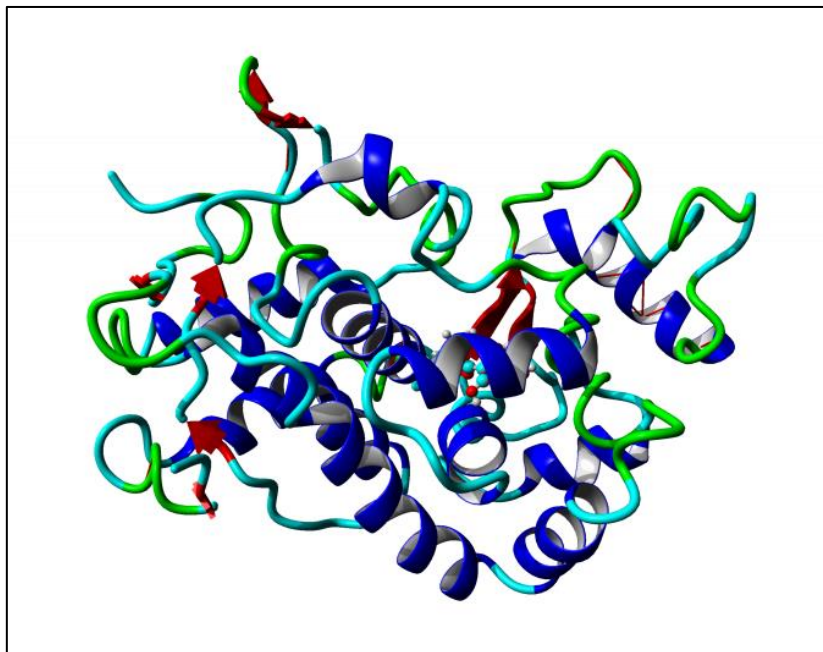
Iako ovaj region nije direktno uključen u katalitičku aktivnost enzima, vezivanje floretina bi moglo sprečiti asocijaciju NADPH, što bi dovelo do akumulacije enzima u neaktivnom obliku (Karakus, 2020), odnosno do ubrzane ireverzibilne inaktivacije katalaze u prisustvu vodonik-peroksida. Ovakav obrazac vezivanja odgovara nekompetitivnoj inhibiciji, za koju je karakteristično vezivanje inhibitora za alosterno mesto, tj. van aktivnog mesta enzima, čime se indukuju konformacione promene koje smanjuju aktivnost enzima. Dobijeni rezultati in silico analize podržavaju rezultate in vitro kinetičkih studija, koje su pokazale nekompetitivni mešoviti tip inhibicije aktivnosti katalaze indukovane floretinom (Poglavlje 4.8.1.2).



Slika 39. Shematski prikaz interakcije floretina sa katalazom. Slika je generisana u programu Yasara (YASARA Biosciences GmbH, Wien, Austrija)

4.8.2.1.2. Interakcija floretina sa peroksidazom

Primena blind dokinga uspešno je identifikovala najpovoljnije mesto vezivanja floretina na molekulu peroksidaze rena (PDB: 1HCH) (**Slika 40**). Energetski najpovoljnija pozicija vezivanja locirana je u katalitičkom centru koji sadrži hem grupu, uz energiju vezivanja od $-8,307 \text{ kcal mol}^{-1}$. Ovaj snažan afinitet ukazuje na formiranje stabilnog kompleksa enzim–ligand.

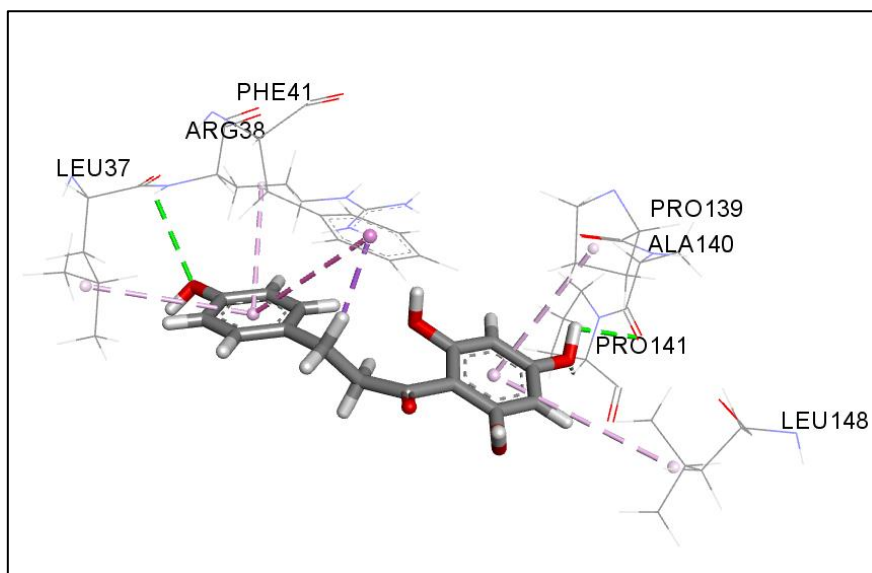


Slika 40. Energetski najpovoljnije mesto vezivanja floretina na peroksidazi. Molekul floretina je prikazan u centralnom delu slike, u vidu strukture sa atomima tirkizne i crvene boje. Struktura peroksidaze generisana je u programu Yasara (YASARA Biosciences GmbH, Wien, Austrija).

Analiza interakcija pokazala je da floretin uspostavlja vodonične veze prvenstveno sa aminokiselinskim ostacima iz katalitičkog regiona, posebno sa Arg38 i Ala140 (**Slika 41**). Ove interakcije su ključne za stabilizaciju liganda u aktivnom mestu i objašnjavaju inhibitorno delovanje floretina na peroksidazu.

Direktno vezivanje floretina za katalitičko mesto, gde se odvija enzimska aktivnost, snažno ukazuje na kompetitivni mehanizam inhibicije. Kod kompetitivne inhibicije, inhibitor (floretin) se takmiči sa supstratom za mesto vezivanja u aktivnom mestu, čime sprečava pristup supstrata i inhibira katalitičku funkciju enzima. Predstavljeni rezultati *in silico* analize u skladu su sa prethodnim *in vitro* kinetičkim studijama koje takođe ukazuju na kompetitivni tip inhibicije aktivnosti peroksidaze indukovane floretinom (Poglavlje 4.8.1.3).

Dobijeni rezultati ukazuju na to da floretin različito moduliše aktivnost katalaze i peroksidaze, što je posledica specifičnosti njihovih vezivnih mesta. Kod katalaze se ispoljava mešovita nekompetitivna inhibicija, dok peroksidaza pokazuje potpuni kompetitivni tip inhibicije. Ova saznanja potvrđuju da su strukturne razlike u vezivnim mestima na molekulu enzima ključne za mehanizam delovanja inhibitora.



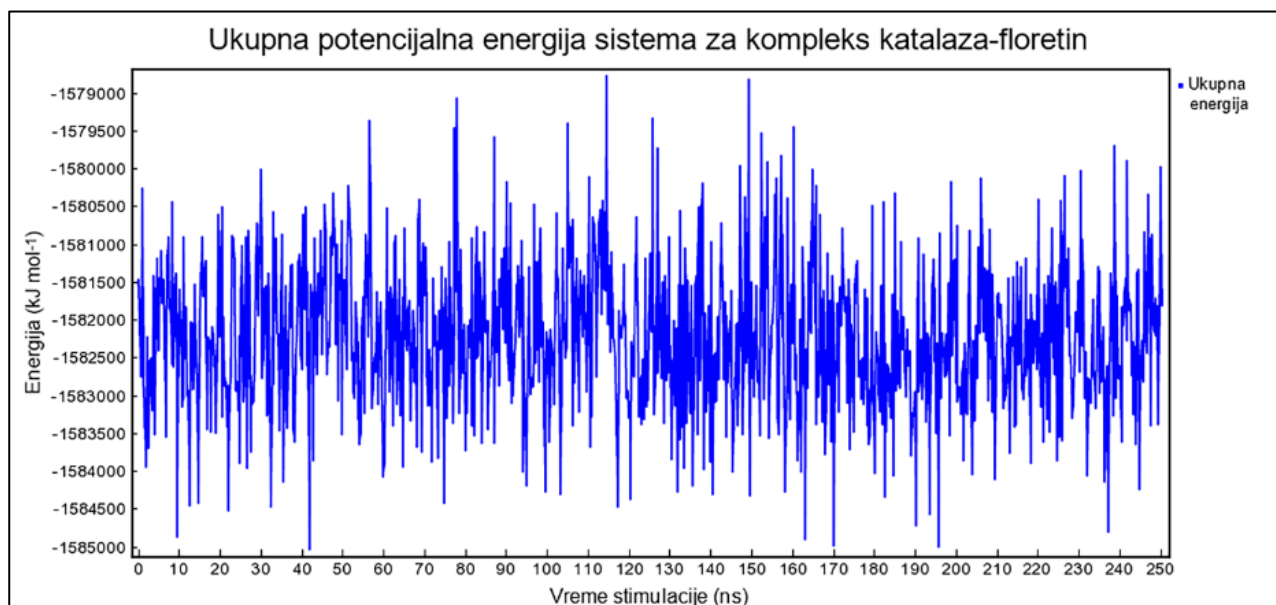
Slika 41. Shematski prikaz interakcije floretina sa peroksidazom. Slika je generisana u programu Yasara (YASARA Biosciences GmbH, Wien, Austrija)

4.8.2.2. Analiza simulacija molekulske dinamike

4.8.2.2.1. Analiza ukupne potencijalne energije

Profil ukupne potencijalne energije za oba sistema: katalaza–floretin i peroksidaza–floretin, analiziran je kako bi se procenila stabilnost i energetska povoljnost kompleksa tokom 250 ns simulacije.

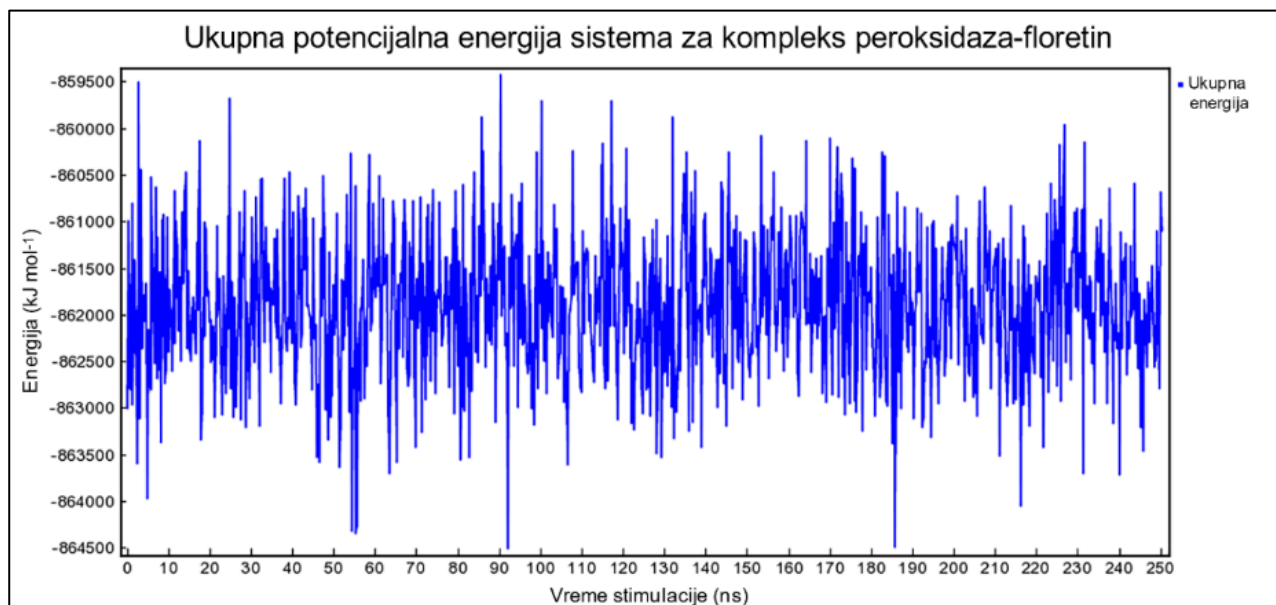
Kod sistema katalaza–floretin, ukupna potencijalna energija se stabilizovala nakon početne faze ekvibracije koja je trajala oko 20 ns.



Slika 42. Ukupna potencijalna energija sistema za kompleks katalaza–floretin. Plava linija predstavlja energiju u kJ mol^{-1} tokom vremena simulacije.

Tokom ostatka simulacije energija je oscilovala oko vrednosti od $-1\,582\,000\text{ kJ mol}^{-1}$ (**Slika 42**), što ukazuje na postizanje stabilnog ravnotežnog stanja. Detaljna analiza energetske komponente pokazala je da elektrostatičke interakcije najviše doprinose ukupnoj energiji (oko 70%), dok su van der Waals-ove interakcije činile oko 20%.

Kod sistema peroksidaza–floretnin, stabilizacija ukupne potencijalne energije postignuta je znatno brže – u roku od približno 10 ns. Energija se kretala oko $-862\,000\text{ kJ mol}^{-1}$ (**Slika 43**), što odražava manju veličinu ovog sistema u poređenju sa katalazom. Analiza komponenta energije pokazala je sličan obrazac kao i kod katalaze – dominaciju elektrostatičkih interakcija.



Slika 43. Ukupna potencijalna energija sistema za kompleks peroksidaza–floretnin. Plava linija predstavlja energiju u kJ mol^{-1} tokom vremena simulacije.

Stabilnost ukupne energije i njenih komponenti u oba sistema pruža čvrste dokaze da pozicije vezivanja identifikovane u molekulskim doking analizama predstavljaju energetski povoljne i stabilne konformacije pod fiziološkim uslovima.

4.8.2.2.2. Analiza srednjeg kvadratnog odstupanja (RMSD)

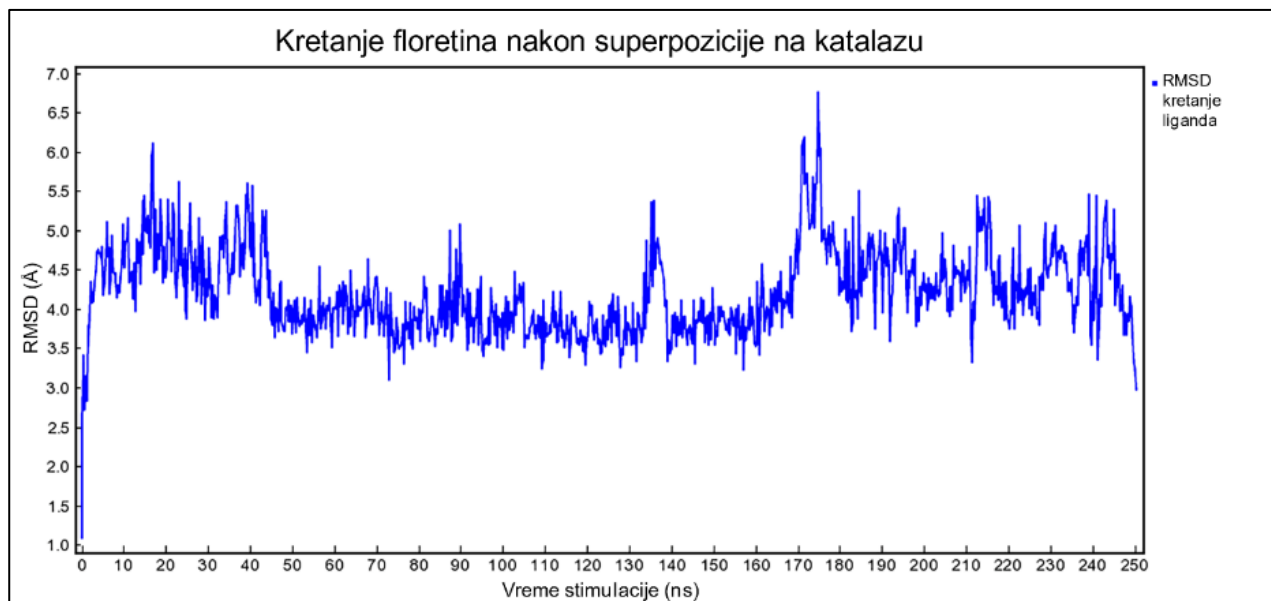
Srednje kvadratno odstupanje (eng. *root mean square deviation*, RMSD) atomskih pozicija kičme proteina izračunato je da bi se procenila strukturna stabilnost enzima tokom simulacije.

Kod katalaze, RMSD vrednosti za kičmu proteina stabilizovale su se između $2,0\text{--}2,5\text{ Å}$ nakon početne faze ekvibracije, što ukazuje na stabilnu strukturu tokom cele simulacije. Kod peroksidaze, RMSD vrednosti bile su nešto niže i stabilizovale su se oko $1,5\text{--}2,0\text{ Å}$, što sugeriše veću rigidnost strukture.

RMSD floretina analiziran je na dva načina:

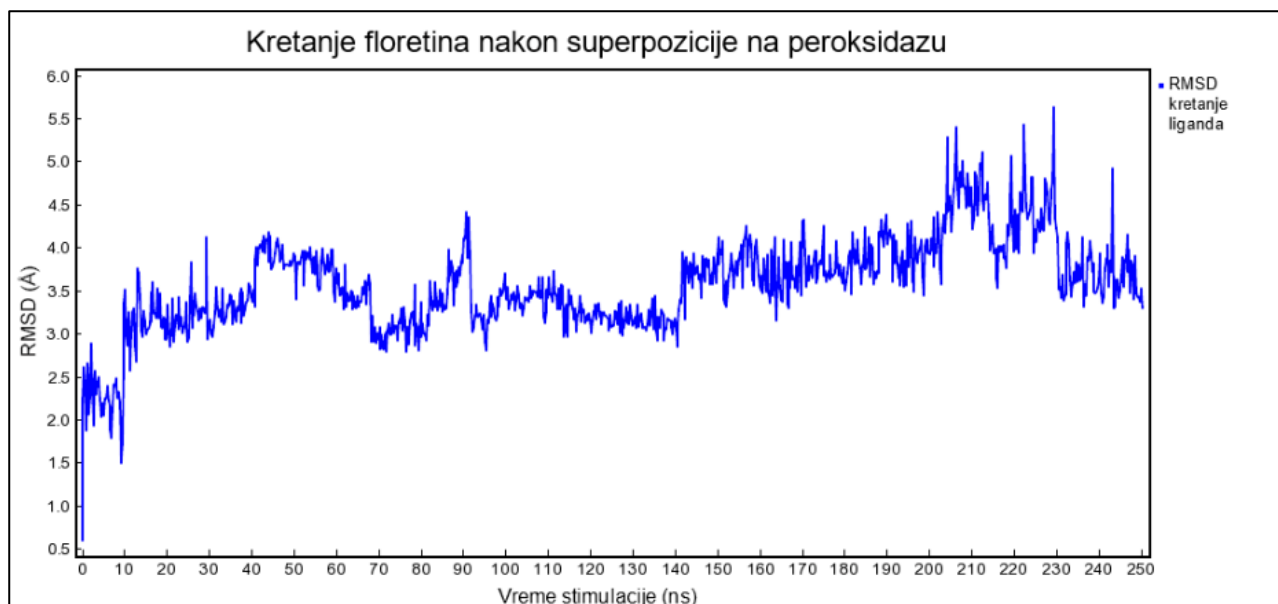
- **RMSD kretanja liganda (floretila) nakon superpozicije na enzim:**

Katalaza–floretil: vrednosti RMSD nakon 10 ns bile su u opsegu 3,5–6,5 Å (**Slika 44**), što ukazuje na umerenu pokretljivost floretila unutar NADP(H) regije. Ovaj rezultat ukazuje na postizanje dinamičke ravnoteže kompleksa nakon, pri čemu floretil zadržava umerenu konformacionu fleksibilnost unutar prostranijeg alosternog NADP(H) džepa.



Slika 44. Kretanje floretila nakon superpozicije na katalazu. Plava linija predstavlja kretanje floretila izraženo u angstromima (Å). Vreme simulacije je mereno u nanosekundama (ns).

Peroksidaza–floretil: RMSD vrednosti bile su niže (2,5–5,5 Å) (**Slika 45**), što ukazuje na čvršće i stabilnije vezivanje u katalitičkom centru. Analiza ovog grafika jasno pokazuje postizanje platoa i minimalne fluktuacije vrednosti nakon početnog perioda ekvibracije, što ukazuje na to da ligand formira rigidan i strukturno stabilan kompleks unutar katalitičkog centra enzima. Ovaj rezultat je od izuzetnog značaja jer niske i stabilne RMSD vrednosti potvrđuju da floretil ne podleže značajnim konformacionim pomeranjima niti disocijaciji iz aktivnog mesta tokom vremena. Čvrsto pozicioniranje unutar katalitičkog džepa direktno onemogućava pristup prirodnom supstratu (vodonik-peroksidu ili fenolnim kosupstratima), što predstavlja strukturnu potvrdu snažnog kompetitivnog inhibitornog potencijala floretila prema peroksidazi.



Slika 45. Kretanje floretina nakon superpozicije na peroksidazu. Plava linija predstavlja kretanje floretina izraženo u angstromima (Å). Vreme simulacije je mereno u nanosekundama (ns).

- **RMSD konformacije liganda (floretina) nakon superpozicije na sam ligand:**

Kod oba kompleksa vrednosti su bile ispod 1,0 Å, što znači da floretin zadržava svoju internu strukturu bez značajnih konformacionih promena.

RMSD analiza potvrđuje da su pozicije vezivanja identifikovane molekulskim doking analizama stabilne tokom celokupne simulacije, a razlike u pokretljivosti floretina dosledne su različitim mehanizmima inhibicije katalaze i peroksidaze.

4.8.2.2.3. Analiza srednjeg kvadratnog kolebanja (RMSF)

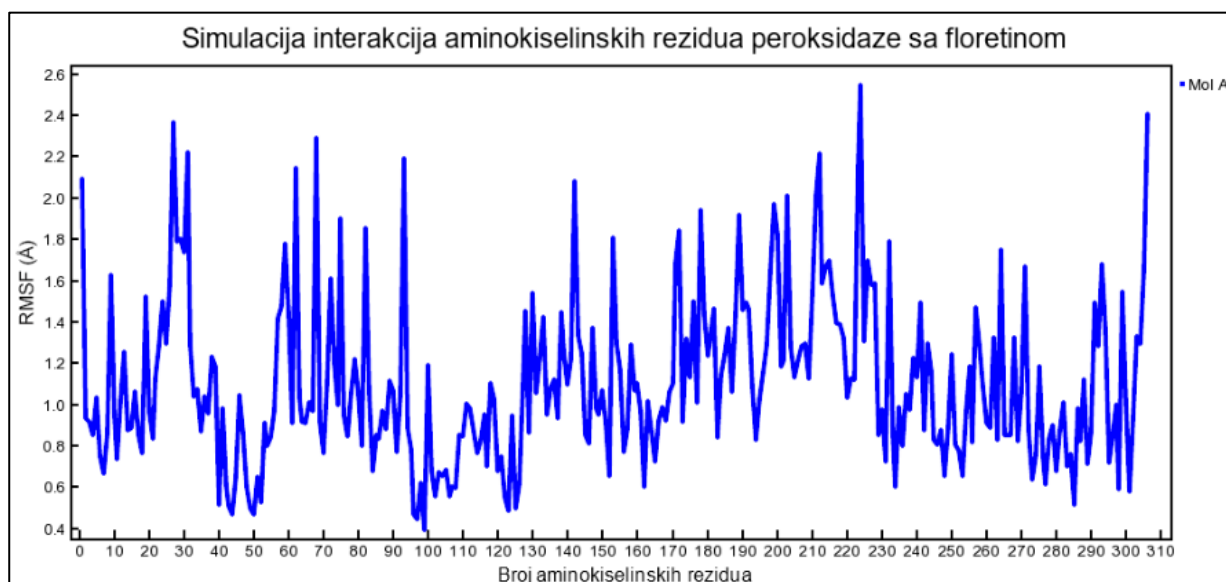
Srednje kvadratno kolebanje (eng. *root mean square fluctuation*, RMSF) izračunato je po aminokiselinskim ostacima katalaze ili peroksidaze kako bi se identifikovale fleksibilne regije. 118region118 ai utvrdio uticaj vezivanja floretina na lokalnu dinamiku u mestima vezivanja za enzim. Ova analiza pruža uvid u dinamičko ponašanje katalaze i peroksidaze nakon vezivanja floretina i pomaže u objašnjenju različitih mehanizama inhibicije utvrđenih u *in vitro* kinetičkim analizama.

Kod katalaze, ostaci iz NADP(H) regije pokazali su izmenjene obrasce fleksibilnosti – neki su postali rigidniji, dok su drugi pokazali povećanu pokretljivost (**Slika 46**) – što ukazuje na alosterički efekat floretina.



Slika 46. Srednje kvadratno kolebanje (eng. *root mean square fluctuation*, RMSF) aminokiselinskih rezidua katalaze pri interakciji sa floretinom tokom simulacije molekulske dinamike.

Kod peroksidaze, ostaci u katalitičkom 119egion, naročito Arg38 i Ala140 pokazali su značajno smanjenu fleksibilnost (**Slika 47**), što ukazuje na stabilizaciju mesta vezivanja prilikom interakcije sa floretinom. Ova imobilizacija ključnih ostataka direktno narušava njihovu konformacionu slobodu neophodnu za katalitički ciklus, tačnije za pravilno pozicioniranje i heterolitičko cepanje vodonik-peroksida, što za posledicu ima drastično smanjenje enzimske aktivnosti (odnosno kompetitivnu inhibiciju peroksidaze).

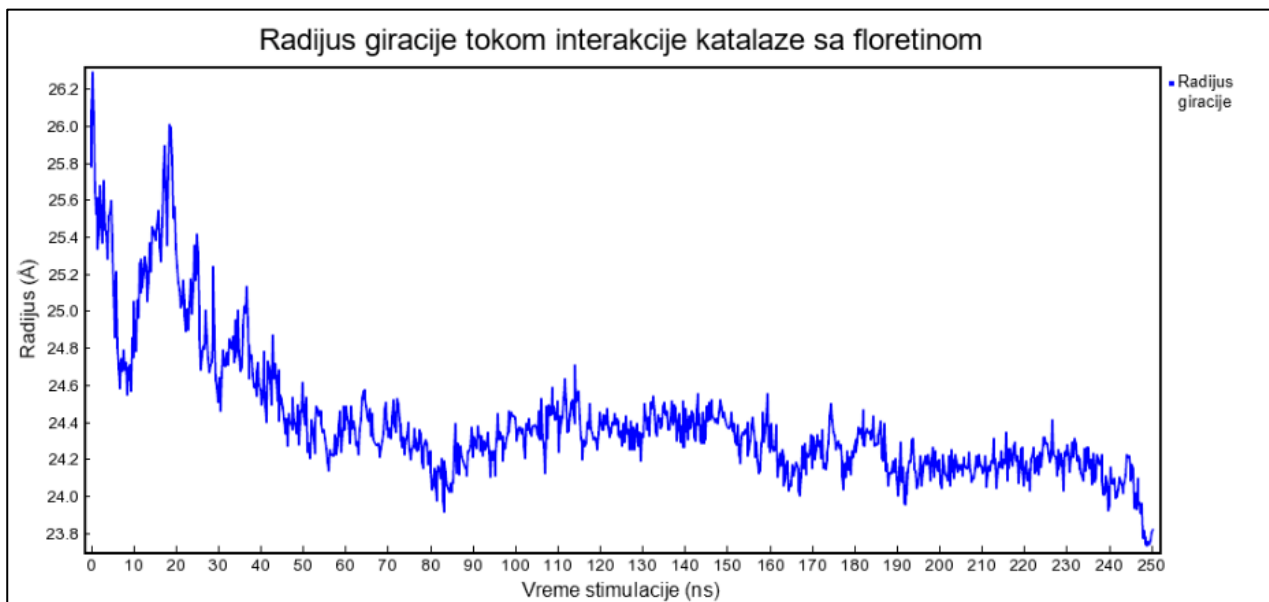


Slika 47. Srednje kvadratno kolebanje (eng. *root mean square fluctuation*, RMSF) aminokiselinskih rezidua peroksidaze pri interakciji sa floretinom tokom simulacije molekulske dinamike.

4.8.2.2.4. Analiza radijusa giracije

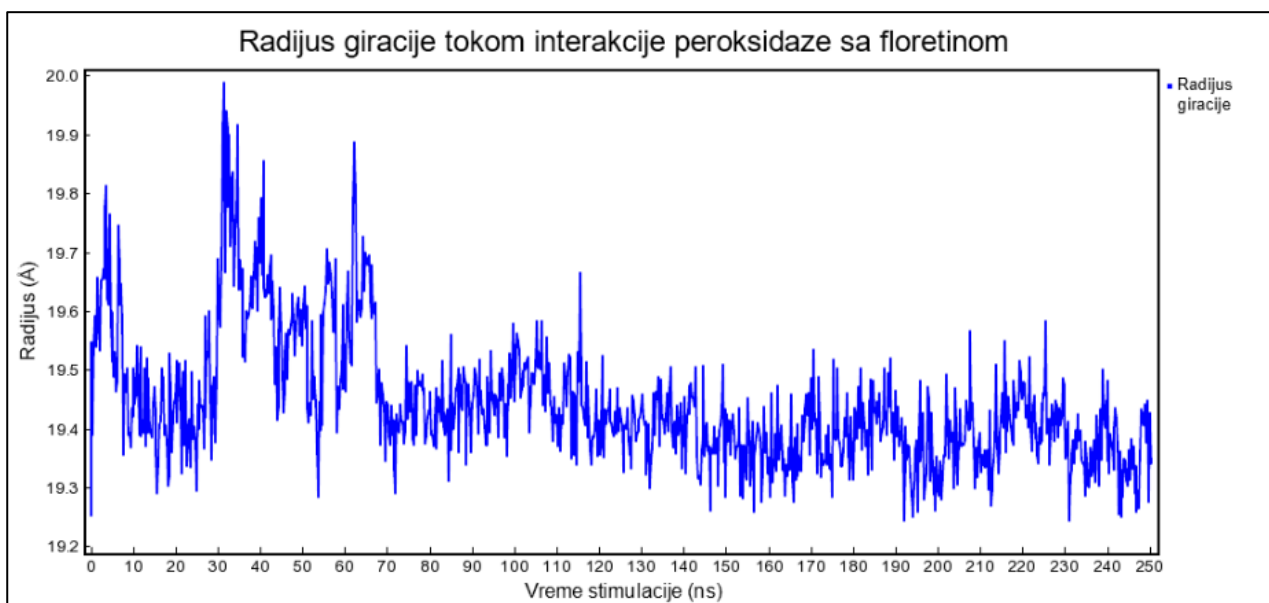
Radius giracije praćen je tokom simulacije molekulske dinamike radi procene ukupne kompaktnosti strukture proteina tokom interakcije sa floretinom.

Kod katalaze, vrednosti R_g su oscilovale u rasponu od 23,8 do 26,2 Å, bez jasnog trenda širenja ili sažimanja proteinske strukture (**Slika 48**). Najveće varijacije zabeležene su tokom prvih 50 ns simulacije, nakon čega su fluktuacije bile minimalne, u okviru oko 1 Å.



Slika 48. Radius giracije tokom interakcije katalaze sa floretinom.

Kod peroksidaze, radius giracije je pokazivao stabilnost u rasponu od 19,2 do 20,0 Å (**Slika 49**). Najveće fluktuacije primećene su tokom prvih 70 ns simulacije, nakon čega je usledio period izražene stabilnosti sa minimalnim odstupanjima.



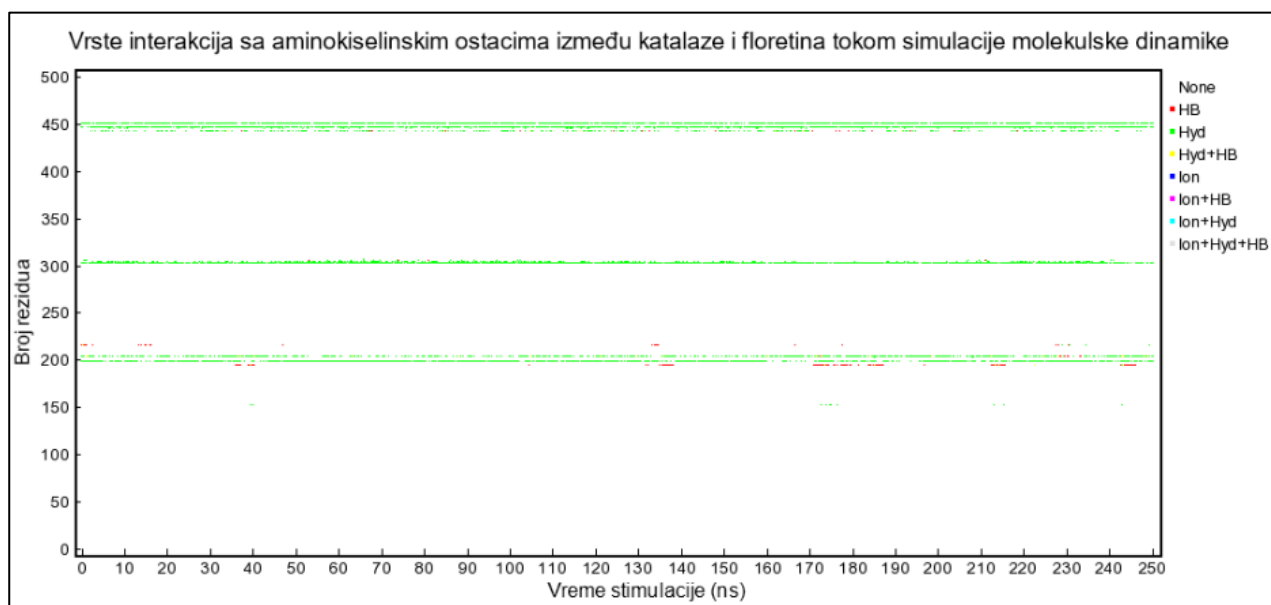
Slika 49. Radius giracije tokom interakcije peroksidaze sa floretinom.

Stabilne vrednosti radijusa giracije u oba sistema ukazuju na to da vezivanje floretina ne izaziva značajne konformacione promene u ukupnoj strukturi enzima.

4.8.2.2.5. Analiza ostvarenih veza

Tokom simulacije molekulske dinamike, analizirane su vodonične veze između floretina i katalaze, odnosno peroksidaze, radi procene specifičnosti i stabilnosti interakcija.

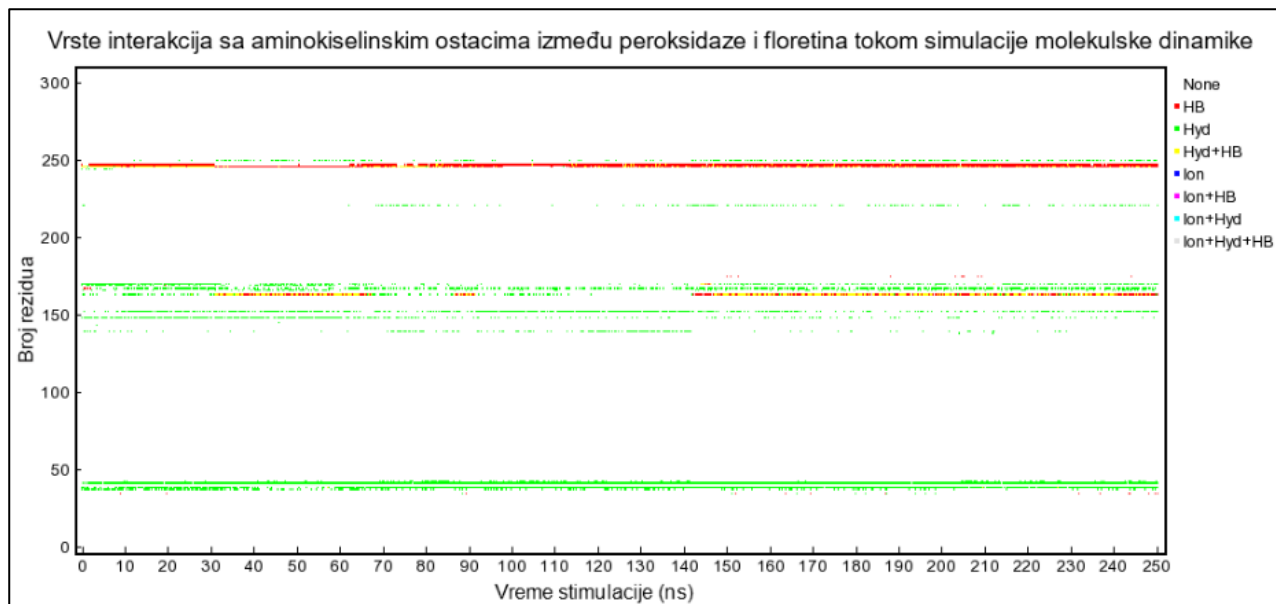
U kompleksu katalaza–floretin, dominantne interakcije koje se održavaju tokom celokupne simulacije uključuju pretežno hidrofobne kontakte (Hyd), naročito izražene u regionima aminokiselinskih ostataka oko 220–230, 300, i 450–470 (**Slika 50**). Ove interakcije su stabilne i dugotrajne, što ukazuje na postojano uklapanje liganda unutar više regija enzima. Vodonične veze (HB) prisutne su u manjoj meri, sa povremenim, ali jasno uočenim pojavama, naročito u ranim fazama simulacije kod aminokiselinskih ostataka oko 220–225, što može ukazivati na inicijalnu stabilizaciju liganda pri ulasku u vezno mesto. Kontakti u regijama oko 300 i 450–470 pretežno su hidrofobne prirode i održavaju se konstantno, što upućuje na značaj ovih aminokiselinskih ostataka u ukupnoj stabilnosti kompleksa. Kompleksniji obrasci interakcija, uključujući kombinacije sa jonskim vezama (Ion+Hyd, Ion+HB itd) javljaju se izuzetno retko, što sugerise da jonske interakcije nemaju značajnu ulogu u stabilizaciji ovog kompleksa. Celokupna interakcijska mapa ukazuje na više stabilnih mesta vezivanja floretina u strukturi katalaze, pri čemu se vezivanje oslanja dominantno na hidrofobne efekte uz minimalan doprinos vodoničnih i jonskih veza.



Slika 50. Vrste interakcija sa aminokiselinskim ostacima između katalaze i floretina tokom simulacije molekulske dinamike. HB – vodonične veze (eng. *hydrogen bond*); Hyd – hidrofobni kontakti; Ion – jonske veze.

U kompleksu peroksidaza–floretin, dominantne interakcije tokom molekulske dinamike obuhvataju prvenstveno hidrofobne kontakte (Hyd), koji su najzastupljeniji i stabilni tokom cele simulacije, posebno izraženi kod aminokiselinskih ostataka u opsegu od 40–60, 150–160 i oko 250 (**Slika 51**). Vodonične veze (eng. *hydrogen bond*, HB) takođe su prisutne i konzistentne, naročito kod

aminokiselinskih ostataka između 245 i 255, što ukazuje na stabilno i dugotrajno vezivanje liganda u ovom regionu enzima. Interakcije kod aminokiselinskih ostataka oko rezidua 250 traju gotovo kontinuirano kroz svih 250 ns, što sugerije da je rezidua 250 ključna za stabilizaciju kompleksa. Nasuprot tome, ostaci iz oblasti 40–60 i 140–160 ostvaruju kontakte kraćeg trajanja i manjeg intenziteta, što može ukazivati na površinske ili tranzitorne interakcije. Većina detektovanih kontakata odnosi se na jednostavne interakcije poput HB i Hyd, dok se kompleksnije kombinacije (Ion+Hyd, Ion+HB) javljaju retko, što upućuje na ograničenu ulogu jonskih veza u stabilizaciji kompleksa peroksidaza–floretila.



Slika 51. Vrste interakcija sa aminokiselinskim ostacima između peroksidaze i floretina tokom simulacije molekulske dinamike. HB – vodonične veze (eng. *hydrogen bond*); Hyd – hidrofobni kontakti; Ion – jonske veze.

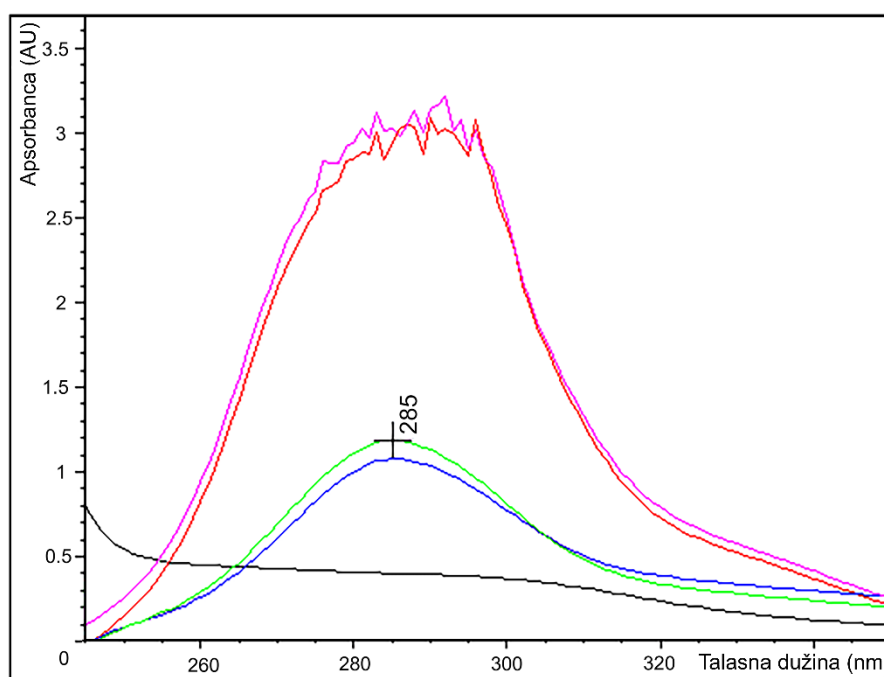
4.9. ANALIZA STABILNOSTI FLORETINA U HRANLJIVIM PODLOGAMA

U cilju praćenja stabilnosti floretina u hranljivim podlogama za gajenje biljaka *in vitro*, sprovedena je spektrofotometrijska analiza uzoraka tečnih hranljivih podloga u kojima su gajene juvenilne biljke, kao i podloga bez biljaka koje su prošle istu eksperimentalnu proceduru kao i podloge sa biljkama. Podloge su uzorkovane nakon prvog i desetog dana tretmana 500 μ M floretinom (tretman) ili 0,1% (v/v) DMSO (negativna kontrola).

Apsorpcioni spektar podloge bez dodatka floretina (negativna kontrola) potvrdio je odsustvo karakterističnog maksimuma na 285 nm, dok je spektar podloge koja je sadržala floretin, bilo sa ili bez juvenilnih biljaka, jasno pokazivao prisustvo ovog maksimuma, potvrđujući prisustvo floretina (Slika 52).

Nadalje, spektri hranljivih podloga sa floretinom, bez juvenilnih biljaka, bili su gotovo identični prvog i desetog dana, što ukazuje na stabilnost jedinjenja i odsustvo degradacije u aseptičnom vodenom rastvoru pri uslovima koji vladaju u sobi za gajenje biljnih *in vitro* kultura (Poglavlje 3.1.3). U podlogama sa juvenilnim biljkama, apsorbanca pri 285 nm bila je niža u poređenju sa podlogama bez juvenilnih biljaka, što sugeriše određeno smanjenje koncentracije floretina. Međutim, ukupan sadržaj floretina ostao je pretežno stabilan između prvog i desetog dana, uz minimalan pad tokom vremena.

Ovi nalazi ukazuju na to da floretin ostaje stabilan u hranljivoj podlozi tokom celokupnog perioda tretmana; međutim, u prisustvu juvenilnih biljaka njegova koncentracija značajno se smanjuje, najverovatnije kao posledica intenzivne apsorpcije koja se odvija tokom prvih 24 h tretmana.

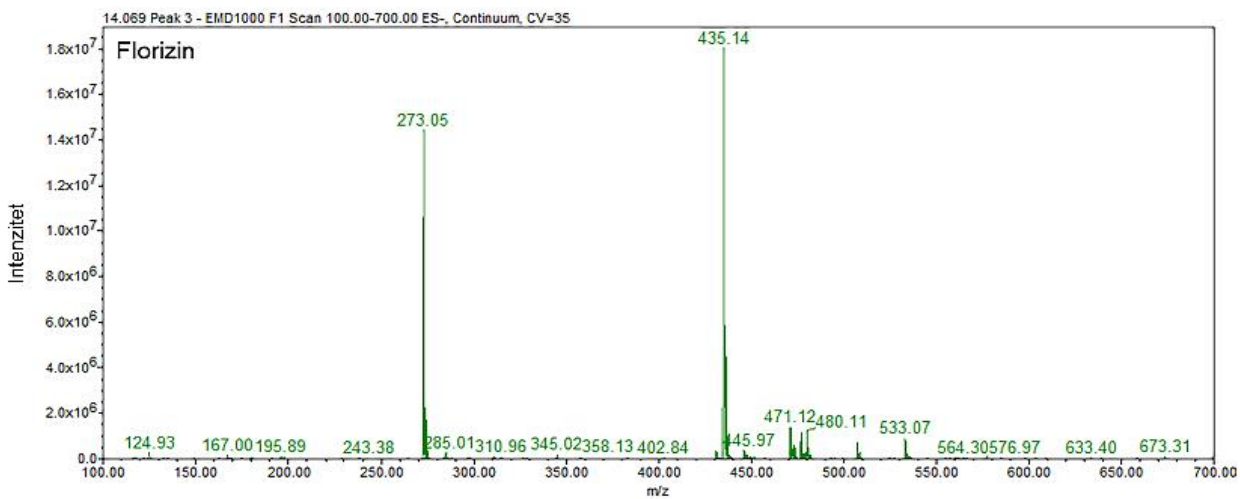
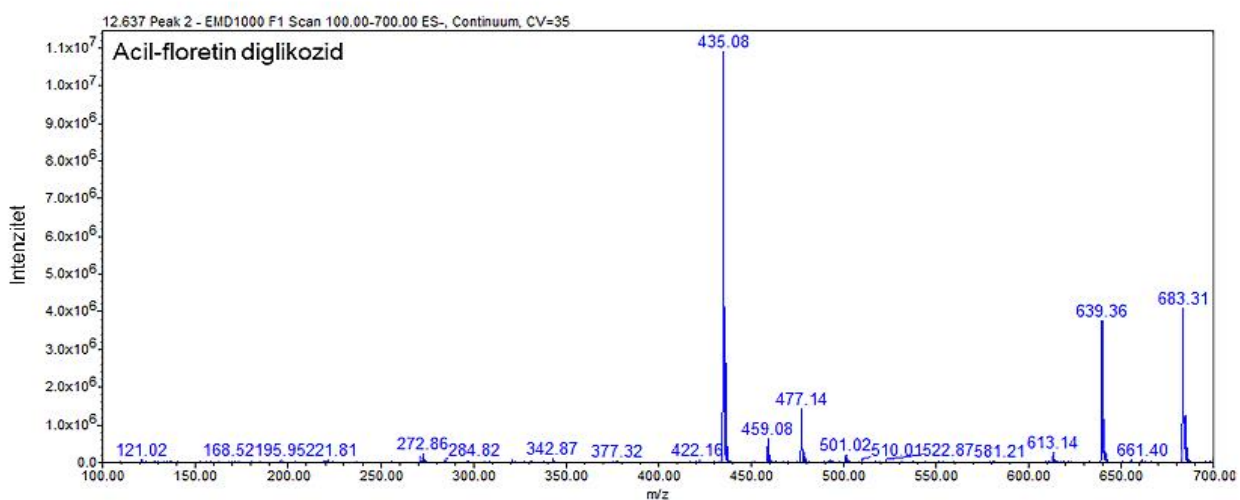
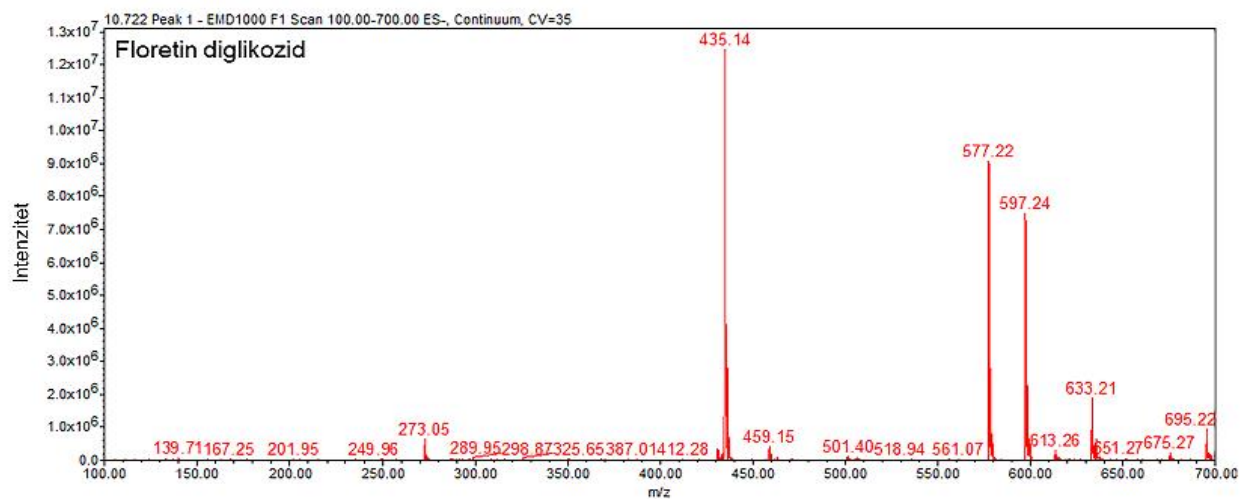


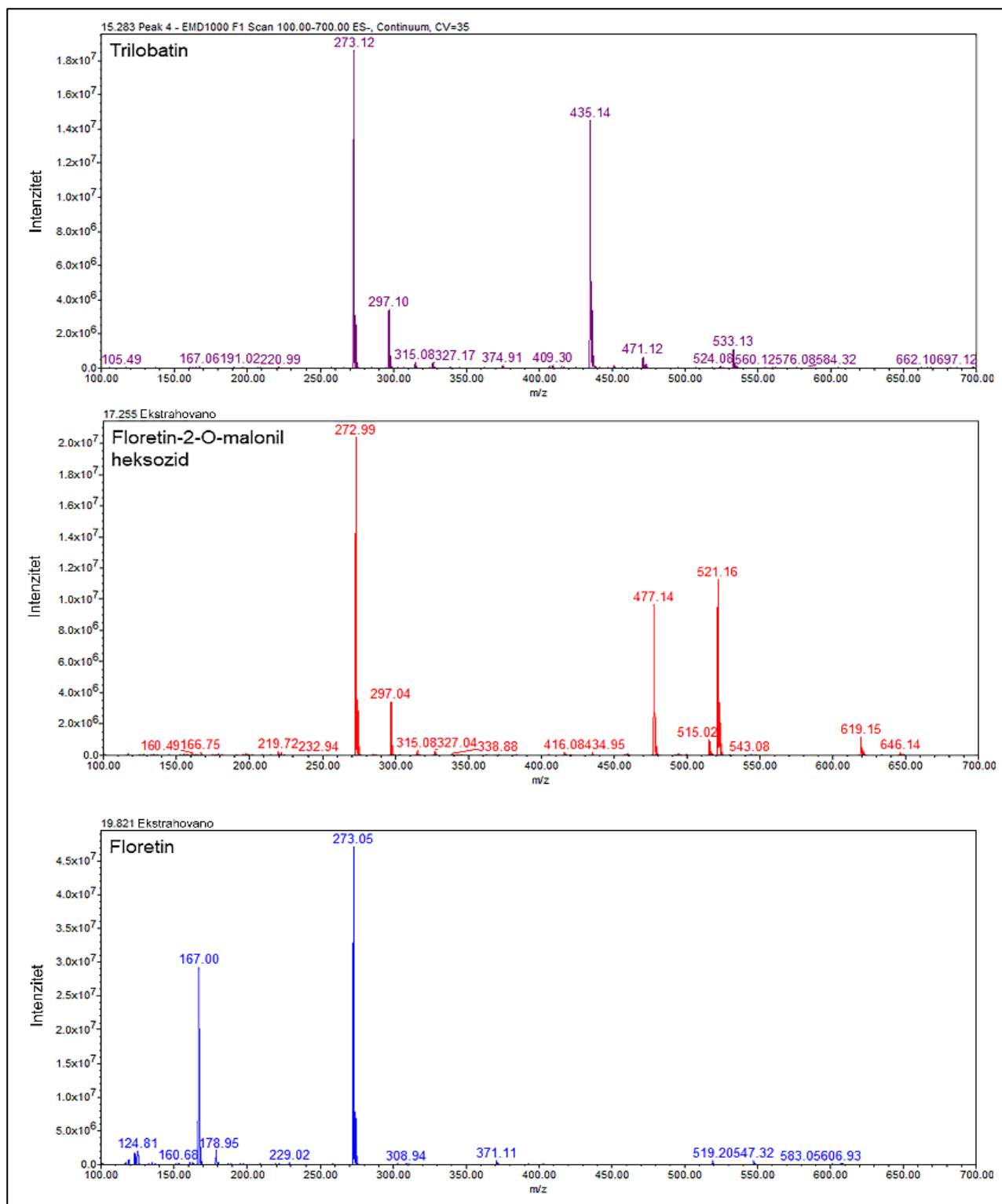
Slika 52. Spektrofotometrijska analiza postojanosti floretina u tečnim hranljivim $\frac{1}{2}$ MS podlogama u toku tretmana. Apsorpcioni spektar: crna linija – podloga bez floretina (negativna kontrola); roze i crvena linija – podloga sa 500 μ M floretinom bez juvenilnih biljaka *A. thaliana*, nakon prvog dana tretmana; crvena linija – podloga sa 500 μ M floretinom bez juvenilnih biljaka *A. thaliana*, nakon desetog dana tretmana; zelena i plava linija – podloga sa 500 μ M floretinom i juvenilnim biljkama *A. thaliana*, nakon prvog dana tretmana; plava linija – podloga sa 500 μ M floretinom i juvenilnim biljkama *A. thaliana*, nakon desetog dana tretmana.

4.10. ANALIZA SADRŽAJA FLORETINA I NJEGOVIH DERIVATA U JUVENILNIM BILJKAMA

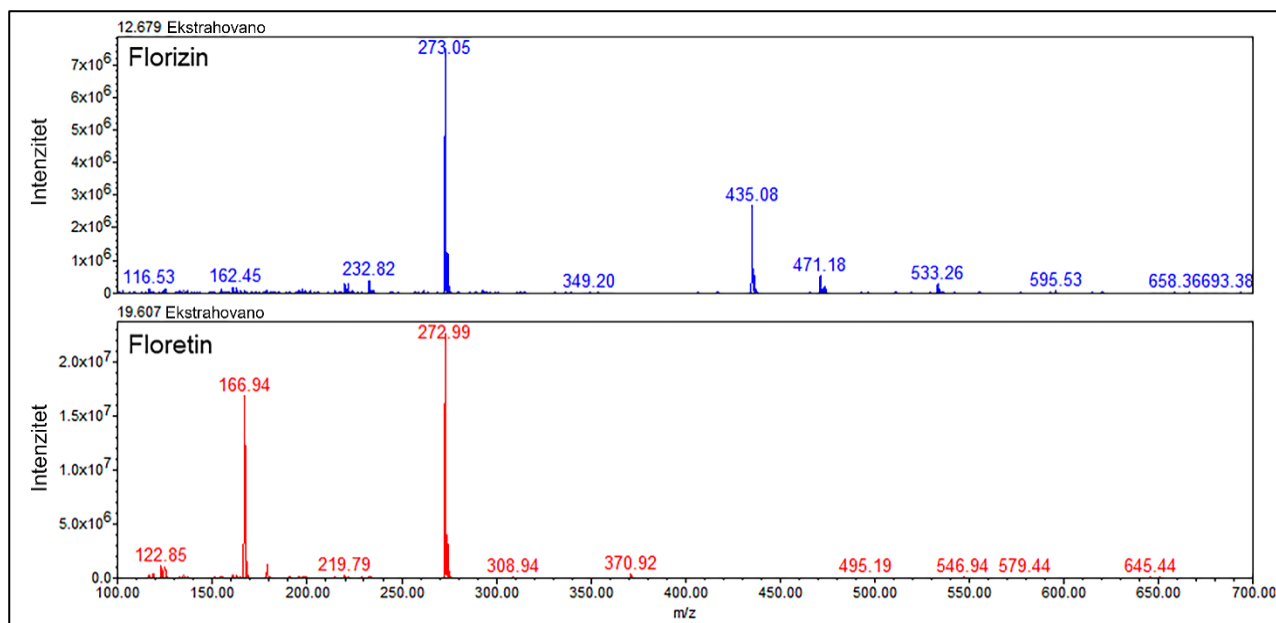
U skladu sa postojećim saznanjima o mehanizmima detoksikacije i eliminacije biološki aktivnih jedinjenja koja su za biljku nepoželjna, a u cilju sprečavanja njihovih negativnih efekata, pretpostavljeno je da nakon apsorpcije floretina od strane juvenilnih biljaka dolazi do njegovog metabolisanja i biosinteze odgovarajućih derivata. U cilju eksperimentalne provere ove pretpostavke, primenom visokoefikasne tečne hromatografije sa masenim detektorom (HPLC/MS), analizirani su metanolni ekstrakti juvenilnih biljaka *A. thaliana* uzorkovani u više vremenskih tačaka tokom tretmana floretinom.

Analiza HPLC/MS izvršena je u ESI (elektroaspršujuća jonizacija, eng. *electrospray ionization*) negativnom režimu skeniranja, a zabeleženi su MS spektri za glavne pikove derivata floretina (**Slika 53**). Za početnu validaciju pikova, korišćen je karakterističan obrazac fragmentacije dobijen za čiste analitičke standarde floretina i florizina (floretin-2'- β -D-glukopiranozid) (**Slika 54**). Poređenjem sa prethodno objavljenim podacima (Zhao i sar., 2014, Qian i sar., 2024; Zheng i sar., 2025), potvrđeno je prisustvo nekoliko metabolita floretina. Trilobatin (floretin-4'- β -D-glukozid), kao očekivani izomer florizina, pokazao je sličan obrazac fragmentacije i nešto duže retenciono vreme u odnosu na florizin (Qian i sar., 2024). Pored toga, MS spektri floretin-diglikozida (floretin-C-3',5'-diglikozid) pokazali su sledeći obrazac fragmentacije: $597 \rightarrow 435 \rightarrow 273$ m/z , što je ukazalo na gubitak dve heksozne jedinice od 162 m/z , u skladu sa prethodno publikovanim spektrima (Zhao i sar., 2014). Prisustvo floretin-2-O-malonil heksozida u ekstraktu juvenilnih biljaka *A. thaliana* potvrđeno je na osnovu karakterističnog obrasca fragmentacije ovog jedinjenja, pri čemu je fragmentacioni događaj $521 \rightarrow 477$ m/z ukazao na gubitak malonilnog fragmenta, a fragmentacioni događaj $521 \rightarrow 273$ m/z na gubitak malonil-heksozidnog fragmenta. Dobijeni fragmentacioni obrazac floretin-2-O-malonil heksozida potvrđen je potpunim poklapanjem sa MS spektrima dobijenim za isto jedinjenje od strane Zhao i sar. (2014).





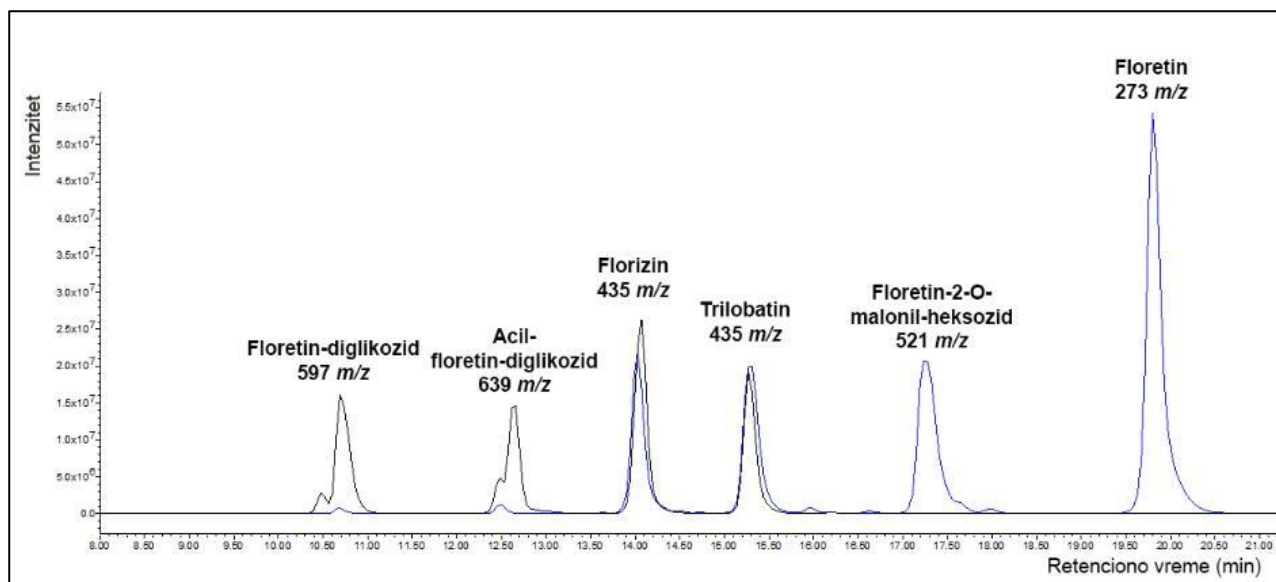
Slika 53. Maseni spektri floretina i njegovih derivata snimljeni u HPLC/MS ESI negativnom skenirajućem režimu (100-1000 m/z). Svaki hromatogram predstavlja maseni spektar određenog metabolita koji prikazuje obrazac fragmentacije pod uslovima opisanim u odeljku Materijal i metode.



Slika 54. Maseni spektri standarda floretina i florizina snimljeni u HPLC/MS ESI negativnom skenirajućem režimu. Molekularni jon na 273 m/z predstavlja floretin, a molekularni jon na 435 m/z predstavlja florizin.

Još jedan derivat potvrđen je kao acilovani oblik floretin-diglikozida sa karakterističnim obrascem fragmentacije: 639→435→273 m/z , što ukazuje na gubitak acil-glukuronidnog fragmenta od 204 m/z i heksoznog fragmenta od 162 m/z (Zhao i sar., 2014, Zheng i sar., 2025).

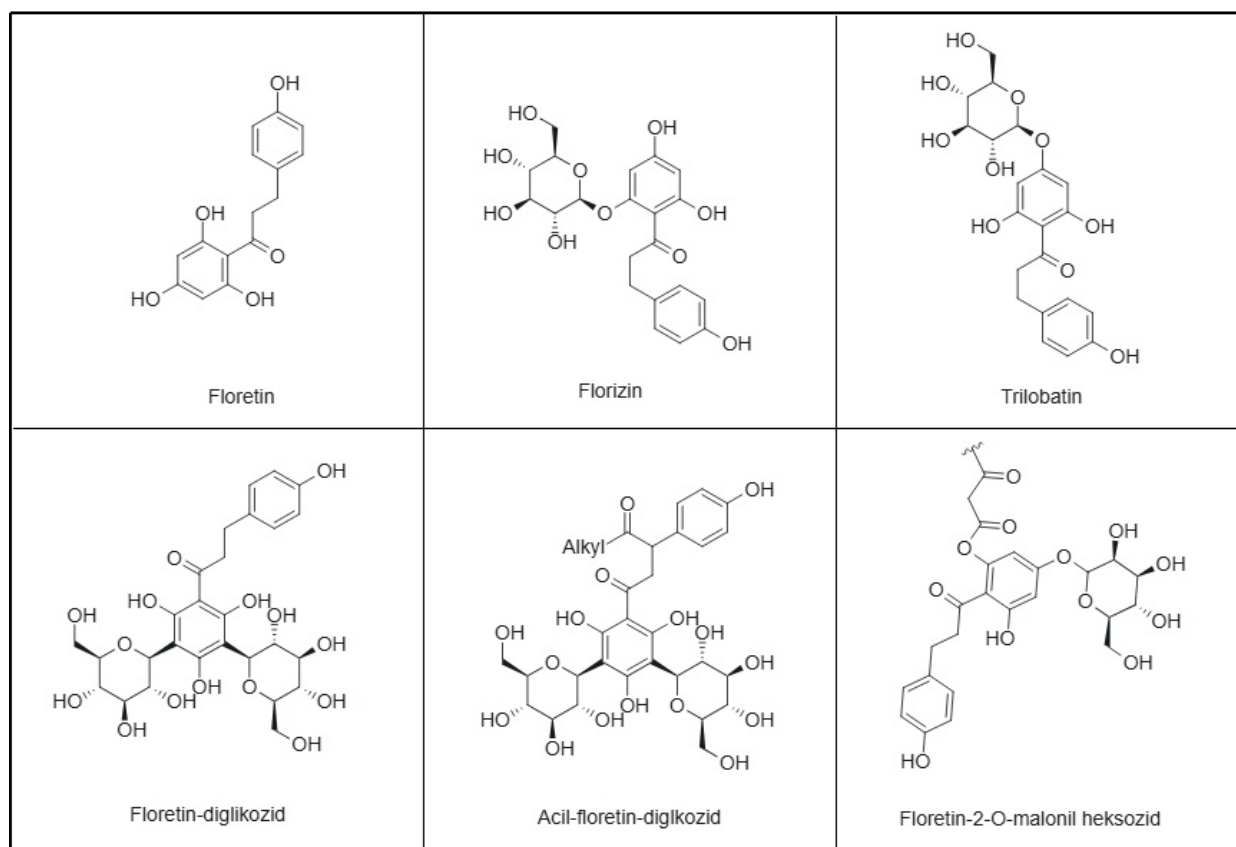
Nakon validacije pikova, korišćeni su SIR (eng. *selected ion recording*) parametri za optimalnu kvantifikaciju pomenutih metabolita. Glavni pikovi u hromatogramima tretiranih juvenilnih biljaka pratili su kvalitativne i kvantitativne promene glikozilovanih derivata floretina, kako mono- tako i diglikozida (**Slika 55**). Od monoglikozida detektovani su florizin i trilobatin koji se razlikuju po položaju glukoznog ostatka. Kod florizina, glukozni ostatak je vezan za hidroksilnu grupu na C-2' atomu, dok se kod trilobatina glikozilacija odvija na C-4' položaju (**Slika 56**). Pored florizina i trilobatina, primećena je pojava diglikozida, kao što su floretin-diglikozid i acil-floretin-diglikozid, kao i pojava heksozida, kao što je floretin-2-O-malonil-heksozid (**Slika 55, 56**). U kontrolnim juvenilnim biljkama nisu detektovani karakteristični hromatografski pikovi koji odgovaraju floretinu ili njegovim derivatima.



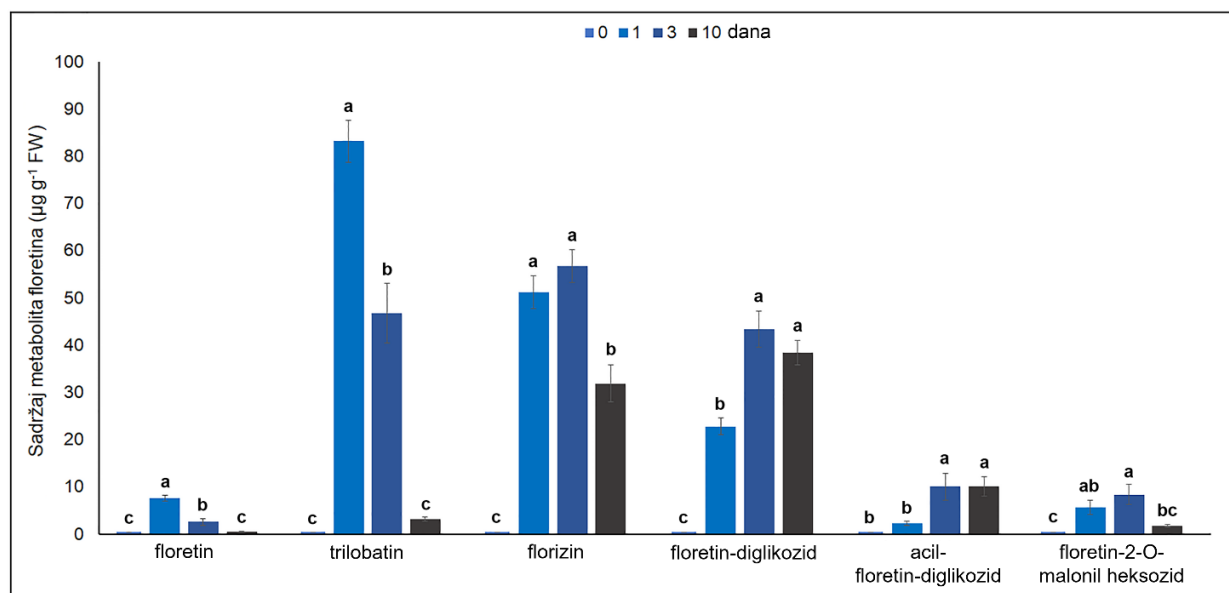
Slika 55. HPLC/MS hromatogram floretina i njegovih metabolita u ekstraktima juvenilnih biljaka *A. thaliana* tretiranih floretinom u trajanju od tri dana, snimljen u SIR (eng. *single ion recording*) negativnom modu. Kao glavni derivati floretina potvrđeni su monoglikozidi (florizin i njegov izomer trilobatin), diglikozidi (floretin-diglikozid i acil-floretin-3'5'-diglikozid) i floretin-2-O-malonil-heksozid. *m/z* – masa/naelektrisanje. Plava linija predstavlja sirove signale na 273 *m/z*, karakteristične za floretin, dok crna linija predstavlja signal prilagođen standardu florizina, koji je snimljen na 435 *m/z*.

Analizom je pokazano da do usvajanja floretina dolazi već u prvih 24 h tretmana, pri čemu je uočen izražen porast akumulacije njegovih glikozilovanih derivata u svim analiziranim vremenskim tačkama (**Slika 57**). Profil floretinskih metabolita, kao i njihova relativna zastupljenost, pokazivali su izraženu vremensku dinamiku (**Slika 57 i 58**). U prvih 24 h izlaganja zabeležena je intenzivna glikozilacija apsorbovanog floretina u klijancima. Posebno izražen porast zabeležen je u sadržaju trilobatina (83,218 $\mu\text{g Flz g}^{-1}$ FW), florizina (51,304 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW) i floretin-diglikozida (22,822 $\mu\text{g Flz g}^{-1}$ FW), čije su vrednosti bile približno 11, 7 i 3 puta veće u odnosu na sadržaj aglikona floretina (7,66 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW) nakon 24 h tretmana (**Slika 57**).

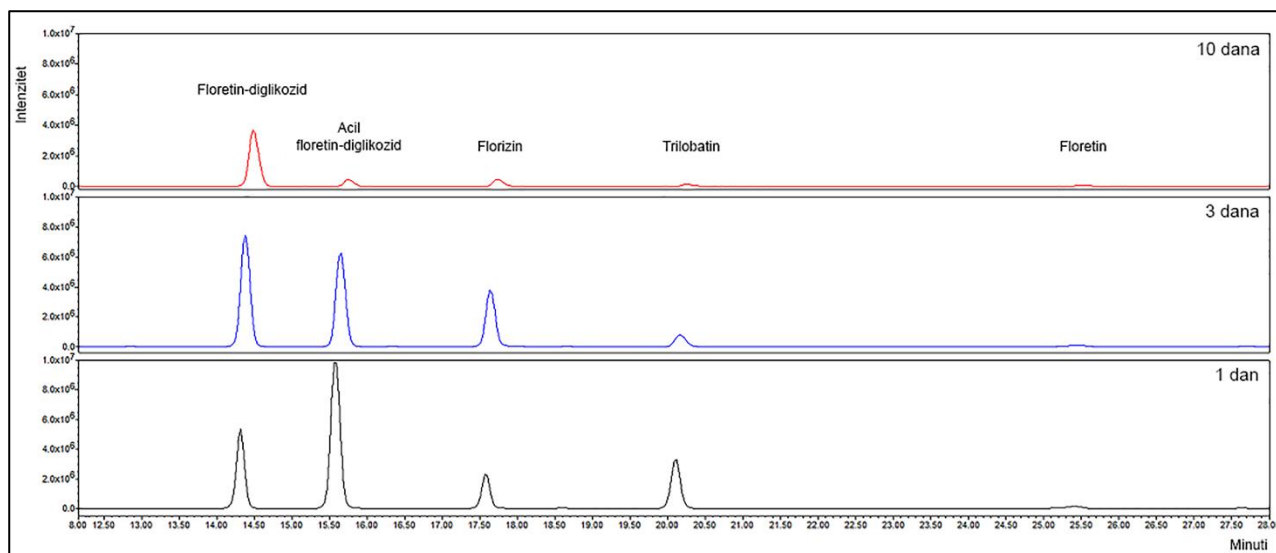
Trećeg dana tretmana, sadržaj monoglikozida trilobatina i florizina i dalje je bio značajan, uz istovremeno uočljivu akumulaciju diglikozida i heksozida. U ovoj fazi, sadržaj trilobatina, florizina i floretin-diglikozida bio je uporediv i iznosio je približno 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW za svako jedinjenje (**Slika 57**). Desetog dana tretmana zabeležen je značajan pad sadržaja slobodnog floretina i njegovih derivata, naročito trilobatina (3,193 $\mu\text{g Flz g}^{-1}$ FW), florizina (31,888 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW) i floretin-2-O-malonil-heksozida (1,797 $\mu\text{g Flt g}^{-1}$ FW), u poređenju sa trećim danom. U ovom trenutku, sadržaj floretina u juvenilnim biljkama bio je minimalan (**Slika 57**).



Slika 56. Strukturne formule floretina i njegovih derivata u tkivima *A. thaliana* nakon tri dana tretmana floretinom. Dizajnirano u softveru Marvin (Chemaxon Ltd, Budimpešta, Mađarska).



Slika 57. Sadržaj floretina i njegovih metabolita u juvenilnim biljkama *A. thaliana* neposredno pre tretmana (0 dana), kao i nakon prvog, trećeg i desetog dana tretmana 500 μM floretinom. Juvenilne biljke su gajene u erlenmajerima, *in vitro*, na $\frac{1}{2}\text{MS}$ tečnoj hranljivoj podlozi. Histogram predstavlja srednje vrednosti sa standardnim greškama (SE), a slova iznad stubića rezultate Fišerovog testa najmanje značajne razlike (LSD), $P < 0,05$. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike u sadržaju istog jedinjenja u različitim vremenskim tačkama (danima tretmana). $\frac{1}{2}\text{MS}$ – polukoncentrovana Murashige i Skoog (1962) hranljiva podloga; FW – sveža masa biljnog tkiva (eng. *fresh weight*).



Slika 58. HPLC/MS SIR hromatogrami snimljeni na 273 m/z ukazuju na promene u obilju metabolita floretina u juvenilnim biljkama *A. thaliana*. Hromatogrami za svaku odabranu vremensku liniju prikazuju kvantitativne promene floretina, florizina i njihovih derivata tokom trajanja eksperimenta. Odabrana vrednost m/z predstavlja najveći broj ispitivanih metabolita, zbog selektivnosti akvizicije SIR HPLC/MS podataka.

Sveukupno posmatrano, rezultati pokazuju da egzogeni floretin indukuje izraženu glikozilaciju u juvenilnim biljkama *A. thaliana* kao ranu komponentu odbrambenog odgovora, nakon čega dolazi do smanjenja nivoa glikozilovanih derivata usled daljih metaboličkih transformacija. S obzirom na ranije opisane fitotoksične efekte, ovi nalazi ukazuju da glikozilacija sama po sebi nije dovoljan mehanizam detoksikacije, već da su dodatne metaboličke modifikacije i/ili subćelijska kompartmentalizacija verovatno neophodne za ublažavanje biološke aktivnosti floretina.

5. DISKUSIJA

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju pionirski doprinos razumevanju fitotoksičnog potencijala floretina i mehanizama njegovog delovanja kod model-biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, u kontekstu njegove potencijalne primene u razvoju bioherbicida. Floretin, prirodno fenolno jedinjenje iz grupe dihidrohalkona, karakteristično za vrste roda *Malus*, poznato je po izraženim antioksidativnim svojstvima i potvrđenim pozitivnim efektima na ljudsko zdravlje. Međutim, njegov potencijal kao alelohemikalije još uvek nije u potpunosti istražen. U tom kontekstu, floretin se može posmatrati kao perspektivna bioaktivna supstanca koja bi, samostalno ili u kombinaciji sa alelohemikalijama drugačijih hemijskih osobina, mogla imati značaj za razvoj ekološki prihvatljivih bioherbicida. Takav pristup je u skladu sa savremenim principima održive poljoprivrede, kao i sa strateškim ciljevima definisanim u okviru Evropskog zelenog dogovora (eng. *European Green Deal*) i Strategije „Od njive do trpeze” (eng. *Farm to Fork Strategy*) koje promoviše Evropska komisija.

5.1. UTICAJ FLORETINA NA RASTENJE, RAZVIĆE I MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE JUVENILNIH BILJAKA

Biljke izložene nepovoljnim uslovima veoma često ispoljavaju morfološke promene koje se manifestuju u vidu usporenog rastenja i razvića. Brojna bioaktivna jedinjenja mogu izazvati inhibiciju klijanja i rastenja kod drugih biljnih vrsta (Heisey, 1999; Singh i sar., 2003; Tawaha i Turk, 2003; Sampietro i Vattuone, 2006). Iako su morfološke promene među prvim uočljivim indikatorima odgovora na stres, one predstavljaju krajnju manifestaciju kompleksnih molekularnih i fizioloških procesa koji im prethode. Naime, u osnovi morfogenetskih procesa nalazi se precizno koordinisana regulacija ćelijskih i međućelijskih događaja kao što su ćelijska deoba, elongacija i diferencijacija ćelija, kao i signalni putevi koji regulišu ove procese (Lymperopoulos i sar., 2018).

Razvojni proces biljaka uslovljen je dinamičnom interakcijom abiotičkih i biotičkih činilaca životne sredine. Abiotički faktori, poput temperature, svetlosnog režima, dostupnosti vode i mineralnih elemenata, direktno utiču na metaboličke i morfogenetske procese, dok biotički faktori, uključujući alelopatske interakcije, prisustvo patogena, parazita i herbivora, modulišu rastenje i razviće kroz složene signalne i odbrambene mehanizme (Heisey, 1999; Steffens i sar., 2005; Parent i sar., 2008; Kami i sar., 2010; Fageria i Moreira, 2011; Costes i sar., 2013; Lipiec i sar., 2013; Subtain i sar., 2014; De Wit i sar., 2016; Těšitel, 2016; Lymperopoulos i sar., 2018; Goyal i sar., 2020; Abbas i sar., 2021; Zhang i sar., 2021; Hu i sar., 2023). Česta posledica delovanja abiotičkih i biotičkih činilaca jeste poremećaj homeostaze fitohormona, koja se direktno odražava na rastenje i razviće biljaka (Lymperopoulos i sar., 2018). Pored toga, ovi faktori mogu uticati i na druge aspekte biljne fiziologije kao što su propustljivost ćelijskih membrana (Galindo i sar., 1999), protok jona (Lehman i Blum, 1999), inhibicija transporta elektrona tokom procesa fotosinteze i disanja (Calera i sar., 1995; Peñuelas i sar., 1996; Abarahim i sar., 2000), oštećenje DNK i nekih proteina (Anaya i Pelayo-Benavides, 1997; Cruz-Ortega i sar., 1998), enzimsku aktivnost i programiranu ćelijsku smrt (Ding i

sar., 2007). Kao neposredna posledica navedenih promena, dolazi do narušavanja procesa ćelijske deobe i elongacije, što se na makroskopskom nivou manifestuje u vidu izraženih morfoloških promena.

5.1.1. Uticaj floretina na klijanje semena

Uticaj alelohemikalija na klijanje biljaka je višestruk i zavisi od niza faktora. U pojedinim slučajevima, ova jedinjenja mogu dovesti do potpune ili delimične inhibicije klijanja, dok u drugim situacijama ne utiču značajno na metaboličke procese u semenu, već primarno ispoljavaju efekat na rastenje i razviće mladih biljaka. Intenzitet i priroda njihovog delovanja uslovljeni su karakteristikama samog hemijskog jedinjenja, njegovom koncentracijom, kao i osetljivošću biljne vrste na koju deluju. Na primer, juglon, sekundarni metabolit karakterističan za crni orah (*Juglans nigra* L.), poznat je po izraženom inhibitornom delovanju na različite fiziološke procese kod biljaka i može značajno usporiti ili u potpunosti zaustaviti klijanje većeg broja biljnih vrsta (Rietveld, 1983). Neki herbicidi biljnog porekla, kao što su *Bioweed*TM i *GreenMatch EX*TM, mogu istovremeno delovati inhibitorno kako na klijanje, tako i na rastenje mladih biljaka. *Bioweed*TM izaziva dehidraciju omotača semena i embriona prilikom kontakta (<https://bioweed.com.au>, 21.01.2026), dok *GreenMatch EX*TM usporava proces klijanja (Han i sar., 2024a). Drugi herbicidi imaju post-emergentno delovanje i oni se najčešće primenjuju folijarno. Utiču na mlade delove biljaka koji imaju primarne ćelijske zidove i sadrže veliku količinu vode, pa su samim tim i osetljiviji. Neki od njih utiču i na korenove, kao na primer sirćetna kiselina, koja oštećuje mlade delove korena pri površini zemljišta.

Rezultati ove doktorske disertacije su ukazali da floretin ne ispoljava značajan uticaj na klijanje semena *A. thaliana*, već deluje na klijance u fazi kotiledona. Slični rezultati zabeleženi su i u istraživanjima sprovedenim u okviru naše istraživačke grupe na rusomači (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik.), gde takođe nije utvrđen efekat floretina na proces klijanja (Đorđić i sar., 2024). Isti obrazac delovanja uočen je i kod zelene salate (*Lactuca sativa* L.) izložene delovanju izolikviritigenina, halkona sa izraženim alelopatskim delovanjem (Zhang i sar., 2020b). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da halkonska struktura predstavlja važan faktor u mehanizmu delovanja ovih alelohemikalija, naročito u kontekstu njihove selektivnosti prema fazi klijanja. U tom smislu, floretin bi mogao da se razmotri kao potencijalno bioaktivno jedinjenje sa ranim post-emergentnim delovanjem.

5.1.2. Uticaj floretina na morfološke parametre juvenilnih biljaka gajenih na hranljivim podlogama u prisustvu saharoze i mio-inozitola

Sprovedena morfometrijska analiza je ukazala na izraženu osetljivost korenovog sistema juvenilnih biljaka *A. thaliana* na delovanje floretina, kako u pogledu izduživanja primarnog korena, tako i promena njegove morfologije i sposobnosti formiranja bočnih i adventivnih korenova. Sličan obrazac delovanja primećen je i kod juvenilnih biljaka *C. bursa-pastoris* koje, kao i *A. thaliana*, pripadaju porodici Brassicaceae. Međutim, značajne razlike primećene su kako u stepenu inhibicije, tako i u razvojnem stadijumu biljke kada se ispoljava maksimalni efekat ovog dihidrohalkona. Naime, za razliku od *C. bursa-pastoris* kod koje je najizraženiji inhibitorni efekat na izduživanje korena od

59,5% postignut u ranim stadijumima razvića biljaka, tj. već nakon 5 dana tretmana 1000 μ M floretinom (Đorđić i sar., 2024), inhibicija izduživanja korena *A. thaliana* na istom tretmanu iznosila je nakon 5 dana samo 36%. Međutim, efekat inhibicije kod *A. thaliana*, iako minimalan u ranim stadijumima razvića klijanaca, postajao je sve izraženiji sa vremenom, dostižući svoj maksimum nakon 10 dana tretmana (75% i 86% inhibicije na tretmanima sa 1000 μ M, odnosno 1500 μ M floretinom). Ovi rezultati ukazuju da floretin može da deluje različitim intenzitetom i sa različitom dinamikom čak i kod veoma srodnih vrsta, kao što su to *A. thaliana* i *C. bursa pastoris*. Slična zapažanja zabeležena su kod biljaka iz porodice trava (Poaceae), odnosno pšenice (*Triticum aestivum* L.), ječma (*Hordeum vulgare* L.) i pirinča (*Oryza sativa* L.), koji su različito reagovali na gajenje u prisustvu dve korovske vrste: tušta (*Portulaca oleracea* L.) i tvrdog ljulja (*Lolium rigidum* Gaud.), poznatih po visokom sadržaju benzoksazinoide kao što su benzoksazin-2(3H)-on (BOA) i 2,4-dihidroksi-7-metoksi-1,4-benzoksazin-3-on (DIMBOA) (González-García i sar., 2025). Može se zaključiti da i u okviru dikotiledonih, kao i u okviru monokotiledonih biljnih vrsta, postoje razlike unutar familija u pogledu načina delovanja alelohemikalija koji je *species*-specifičan.

Zapažena je značajna inhibicija rastjenja korena i izdanaka kukuruza nakon tri nedelje tretmana floretinom u uslovima *in vitro* (Constantin i sar., 2025a). Dozno-zavisna inhibicija izduživanja korena uočena je već kod trodnevnik klijanaca pri primeni floretina u koncentracijama od 50, 100, 250 i 500 μ M, dok je tretman 500 μ M floretinom doveo do intenzivne inhibicije od 93%, što je gotovo trostruko snažniji efekat floretina nego u slučaju juvenilnih biljaka *A. thaliana* u sličnom stadijumu razvića (36%). Dobijeni rezultati potvrđuju da floretin, slično drugim alelohemikalijama, različito deluje na monokotiledone i dikotiledone biljne vrste. Međutim, iako postoje razlike u odgovoru biljnih vrsta na floretin, dozno-zavisna inhibicija rastjenja podzemnih i nadzemnih organa i promena boje korena u svetlo braon nijansu, kao i hloroza listova, zajedničke su za sve tretirane vrste. Sveukupno, može se zaključiti da floretin ispoljava dosledan inhibitorni efekat na izduživanje korena ispitanih biljnih vrsta, dok se intenzitet inhibicije i stepen oštećenja mora proceniti za svaku pojedinačnu vrstu, čak i u stabilnim uslovima *in vitro* kulture.

Efekat floretina na juvenilne biljke *A. thaliana* uočen je i u pogledu supresije razvoja bočnih korenova, što je naročito bilo izraženo nakon tretmana u trajanju od 15 dana. U odsustvu stresa, postembrionalna inicijacija bočnih korenova se kod *A. thaliana* odvija akropetalno, iz pericikla, u zoni diferencijacije primarnog korena (Blakely i Evans, 1979; Celenza i sar., 1995;). Ovaj proces je primarno regulisan polarnim transportom auksina, čija dinamika u bazalnom meristemu determiniše prostorni raspored i organizaciju primordija (Swarup i sar., 2008; Péret i sar., 2012). Poremećaji u homeostazi ili fluksu ovog fitohormona, bilo usled prekomerne ekspresije regulatornih proteina poput serin/teonin-kinaze PINOID kinaze (PID) (Christensen i sar., 2000) ili enzima uključenog u biosintezu auksina TAA1 (eng. *TRP aminotransferase of arabidopsis 1*), kao i diferencijalne ekspresije PIN transportnih proteina (Pasternak i sar., 2019), rezultuju značajnom inhibicijom razvoja bočnih korenova. Shodno tome, tretmani floretinom u koncentracijama od 500 μ M i 1000 μ M indukovali su dozno-zavisnu supresiju razvoja bočnih korenova kod juvenilnih biljaka *A. thaliana* (75,6%) i *C. bursa-pastoris* nakon 10 dana (58,9%), pri čemu je inhibitorni efekat bio izraženiji kod prve vrste, što ukazuje na specifičnu osetljivost transportnih mehanizama auksina unutar iste familije.

Za razliku od bočnih korenova koji nastaju iz ćelija pericikla, adventivni korenovi mogu nastati iz različitih tkiva i tipova ćelija (Geiss i sar., 2009). Formiranje adventivnih korenova predstavlja kompleksan proces uslovljen interakcijom brojnih egzogenih i endogenih činilaca, poput nutrijenata, svetlosti, temperature, aktivnosti enzima i fitohormona (Geiss i sar., 2009; Verstraeten i

sar., 2014). Auksini imaju naročito značajnu ulogu u procesu formiranja adventivnih korenova (De Klerk i sar., 1999; Péret i sar., 2009, 2013; Pop i sar., 2011; Dastidar i sar., 2012; Lavenus i sar., 2013). Faktori stresa, kao što su mehanička oštećenja i alelohemikalije poput fenolnih jedinjenja, mogu indukovati pojavu adventivnih korenova remeteći homeostazu auksina (Curir i sar., 1990; De Klerk i sar., 1999; Verstraeten i sar., 2014). Kod *A. thaliana*, mutantna linija (eng. *transparent testa 4*, *tt4*), koja poseduje mutaciju u genu koji kodira halkon-sintazu, ključni enzim u biosintezi flavonoida, takođe pokazuje povećan broj bočnih i adventivnih korenova u poređenju sa biljkama divljeg tipa. Kod ovih biljaka, transport auksina je uvećan posebno u hipokotilu i cvastima (Brown i sar., 2001). Rezultati morfometrijskih analiza juvenilnih biljaka *A. thaliana* tretiranih floretinom ukazuju da niže koncentracije floretina dovode do blage inhibicije formiranja adventivnih korenova, dok više koncentracije u inicijalnoj fazi tretmana ispoljavaju stimulatívni efekat. Međutim, produženim izlaganjem biljaka floretinu dolazi do smanjenja razlika između tretiranih uzoraka i kontrole, što sugeríše da efekat ovog jedinjenja zavisi kako od primenjene koncentracije, tako i od dužine trajanja tretmana.

Usporeno rastenje nadzemnih organa, iako manje izraženo u odnosu na promene u korenu, ukazuje na to da je floretin uticao na juvenilne biljke *A. thaliana* u celini. Ovi efekti manifestovali su se usporenim izduživanjem izdanaka, smanjenim brojem listova i pojavom hloroze. Razlike u fitotoksičnom potencijalu floretina između *A. thaliana*, *C. bursa-pastoris* i *Z. mays* ponovo su potvrđene u kontekstu inhibicije rasta izdanaka. Kod izdanaka *C. bursa-pastoris*, maksimum inhibicije izduživanja izdanaka postignut je nakon 14 dana tretmana 1000 μM floretinom (29,7%) (Đorđić i sar., 2024), dok je primena iste koncentracije kod juvenilnih biljaka *A. thaliana* rezultovala gotovo dvostruko većim procentom inhibicije (48,1%). Površina listova *Z. mays* tretiranih 500 μM floretinom nakon tri nedelje bila je za 42% manja u odnosu na kontrolu, dok je dužina izdanaka bila smanjena za 12% (Constantin i sar., 2025a). Ovakva razlika u odgovoru ukazuje na veću osetljivost vrste *A. thaliana* na delovanje floretina u odnosu na *C. bursa-pastoris* i *Z. mays*, što može biti posledica specifičnosti u hormonskoj regulaciji, metabolizmu sekundarnih metabolita ili kapacitetu detoksifikacionih mehanizama između ispitivanih vrsta.

Generalno, rezultati ove doktorske disertacije ukazali su da floretin deluje inhibitorno na rastenje i razviće juvenilnih biljaka *A. thaliana* gajenih u uslovima *in vitro* kulture, ispoljavajući intenzivniji efekat na rastenje i razviće korena nego na rastenje nadzemnih delova. Ovo zapažanje je u skladu sa tvrdnjom da korenov sistem ima veću osetljivost na alelohemikalije od nadzemnih delova biljke, zbog visoke propustljivosti tkiva korena (Nishida i sar., 2005; Abu-Romman i Ammari, 2015; Abd El-Gawad, 2016; Mitić i sar., 2018). Tako je, na primer, utvrđeno da eksudati korena *Malus hupehensis* Rehd., koji sadrže dihidrohalkone u visokom procentu, ispoljavaju izraženiji alelopatski uticaj na rastenje korena iste vrste u poređenju sa rastenjem izdanaka (Sun i sar., 2022). Brojni istraživači su takođe potvrdili snažniji efekat alelohemikalija na rastenje korena i masu podzemnih organa u odnosu na nadzemne delove biljke (Khan i Kato-Noguchi., 2016; Ghani i sar., 2023).

5.1.3. Uticaj floretina na morfološke parametre juvenilnih biljaka gajenih na hranljivim podlogama bez saharoze i mio-inozitola

Egzogeni ugljeni hidrati u hranljivim podlogama za *in vitro* kulturu obezbeđuju neophodan izvor energije i ugljenika za intenziviranje rastenja biljaka. Ovakav pristup temelji se na miksotrofnoj prirodi eksplantata, koji se u laboratorijskim uslovima udaljavaju od svog primarno autotrofnog načina ishrane karakterističnog za prirodno okruženje. Međutim, eksperimenti sprovedeni na hranljivim podlogama bez saharoze i mio-inozitola potencijalno bolje odražavaju prirodne uslove rastenja biljaka, budući da u prirodnim supstratima ne postoje visoke koncentracije slobodnih šećera. U zemljištu mogu biti prisutni različiti ugljeni hidrati, poput celuloze i heksoza, dok saharoza uglavnom potiče iz korenskih eksudata i brzo se razgrađuje do ugljen-dioksida delovanjem mikroorganizama (Gunina i Kuzyakov, 2015).

Rezultati ove doktorske disertacije ukazali su da floretin ispoljava izraženije inhibitorno delovanje na koren *A. thaliana* na hranljivoj podlozi bez saharoze i mio-inozitola (BSIM), nego na klasičnoj hranljivoj podlozi koja sadrži ove nutrijente (SIM). Zapaženo je da je IC_{50} vrednost za izduživanje korena dostignuta već na koncentraciji od 125 μM floretina nakon 10 dana tretmana, u poređenju sa klasičnim SIM podlogama na kojima je ova vrednost dostignuta tek na koncentraciji od 400 μM . Mogući uzrok ove pojave jeste smanjena dostupnost izvora energije na BSIM podlogama. S obzirom na to da floretin narušava strukturu i funkcionalni integritet hloroplasta, usled čega je biljka primorana da energiju obezbeđuje mobilizacijom prisutnih rezervi skroba, njihovo intenzivno iscrpljivanje započinje već u ranim fazama tretmana, odnosno pre desetog dana izloženosti. Odsustvo saharoze u hranljivoj podlozi i nemogućnost njene egzogene suplementacije verovatno doprinosi pojavi energetskog deficita kod juvenilnih biljaka. U skladu sa tim, zapaženo je da je plato maksimalnog delovanja floretina formiran već pri koncentraciji od 500 μM na BSIM podlozi, što potvrđuje povećanu osetljivost juvenilnih biljaka na ovu alelohemikaliju u uslovima ograničenog energetskog snabdevanja.

Na BSIM podlogama zabeležena je prolazna stimulacija razvoja bočnih korenova desetog dana tretmana, koja je korelirala sa porastom koncentracije floretina (250–1000 μM). Međutim, nakon 15 dana, ovaj efekat je iščezao, a inhibicija je postala ujednačena na svim primenjenim tretmanima. Očigledno je da je stres floretinom izazvao prolaznu stimulaciju razvoja bočnih korenova najverovatnije kao način prevazilaženja inhibicije rastenja primarnog korena. Međutim, konačan procenat inhibicije formiranja bočnih korenova na BSIM podlozi bio je manji nego na klasičnoj SIM podlozi, što je ukazalo da odsustvo saharoze i mio-inozitola ublažava inhibiciju izazvanu floretinom. Ovaj nalaz je u skladu sa saznanjima da dostupnost šećera i nutrijenata, prvenstveno nitrata i saharoze, ima ključnu ulogu u određivanju mesta inicijacije i intenziteta formiranja bočnih korenova (Malamy i Ryan, 2001; Malamy, 2005; Nibau i sar., 2008; Petricka i sar., 2012; Roycewicz i Malamy, 2012).

Kod juvenilnih biljaka gajenih na BSIM podlogama uočeno je veoma izraženo dozno-zavisno povećanje učestalosti formiranja adventivnih korenova. Za razliku od SIM podloga, formiranje adventivnih korenova bilo je stimulirano floretinom u obe vremenske tačke (10 i 15 dana tretmana). S obzirom na sporiji razvoj juvenilnih biljaka na BSIM podlogama, verovatno je odsustvo saharoze i mio-inozitola produžilo stimulatorni efekat floretina na formiranje adventivnih korenova, koji je karakterističan za ranu fazu razvoja biljaka na SIM podlogama. Ova pojava može ukazivati na potencijalni mehanizam adaptivnog odgovora ili tolerancije na floretin. Takođe je primećeno da su adventivni korenovi biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom floretina bili u znatno boljem

fiziološkom stanju u poređenju sa primarnim i bočnim korenovima. Jedno od mogućih objašnjenja ove pojave može biti njihovo razvojno poreklo. Naime, floretin ispoljava slabiji efekat na nadzemne delove biljke, a samim tim i na adventivne korenove koji nastaju iz hipokotila, a kasnije iz stabla.

U skladu sa efektom odsustva saharoze i mio-inozitola na rastenje i razviće korena, rastenje izdanaka kako kontrolnih, tako i tretiranih biljaka bilo je sporije u odnosu na SIM podlogu. Iako je floretin ispoljio znatno izraženije efekte na rastenje i razviće korena u odsustvu saharoze i mio-inozitola, efekti na izdanak bili su slabije izraženi u odsustvu ovih nutrijenata. Najizraženija inhibicija izduživanja izdanaka na BSIM podlozi zabeležena je nakon 15 dana tretmana 1500 μM floretinom i iznosila je 30,4%, dok je odgovarajući efekat floretina na SIM podlozi iznosio 54,2%. Ova kontradiktornost koja se uočava prilikom poređenja procenta inhibicije izduživanja izdanaka na ove dve vrste podloga, može biti prividna, s obzirom na to da se izražava u odnosu na dužinu izdanaka kontrolnih jedinki koje su u slučaju BSIM podloga značajno sitnije i slabije razvijene od klasično gajenih biljaka.

Sveukupno posmatrano, rezultati morfometrijskih analiza nedvosmisleno su ukazali na snažan inhibitorski efekat floretina na juvenilne biljke *A. thaliana* gajene u *in vitro* uslovima nezavisno od prisustva nutrijenata u hranljivoj podlozi, što potkrepljuje mogućnost njegove potencijalne primene u dizajniranju novih, ekološki bezbednih herbicida.

5.1.4. Uticaj floretina na rastenje i prirast mase juvenilnih biljaka tretiranih posredstvom korena

S obzirom na to da su prethodna istraživanja potvrdila da floretin najviše utiče na korenov sistem tretiranih biljaka, ispitivanje uticaja floretina na prirast mase juvenilnih biljaka tretiranih posredstvom korena sprovedeno je u cilju buduće potencijalne primene floretina putem irigacije. Dobijeni rezultati potvrdili su značajno dozno-zavisno smanjenje dužine i mase nadzemnih delova biljaka kod kojih ovi organi nisu dolazili u direktni kontakt sa floretinom, što sugerise postojanje mehanizama za transport ovog dihidrohalkona iz korena u nadzemne delove biljke.

Dosadašnja istraživanja ukazuju na postojanje četiri primarna modela transporta flavonoida u biljkama: transport posredovan glutathion S-transferazom (eng. *glutathione S-transferase*, GST) i transportnim proteinima označenim kao: MATE (eng. *multidrug and toxic compound extrusion*), MRP (eng. *multidrug resistance-associated protein*) i BTL (eng. *bilitranslocase-homolog*) (Manzoor i sar., 2023).

Sistemi GST i MRP primarno su uključeni u transport antocijana (Manzoor i sar., 2023). Glutathion S-transferaze, ranije klasifikovane kao ligandini, uključeni su u fazu II detoksikacije. Ovi enzimi katalizuju konjugaciju redukovanog oblika glutathiona sa ksenobiotskim supstratima, što predstavlja ključni korak u procesima detoksikacije. U biljnim organizmima GST predstavlja genetičku superporodicu; primera radi, kod model-biljke *A. thaliana* identifikovano je 47 članova sa specifičnim funkcijama. Funkcionalna diverzifikacija ovih proteina manifestuje se kroz razlike u specifičnosti prema supstratu i intracelularnom usmeravanju, poput transporta u vakuolu ili ekstracelularni prostor (Xu i sar., 2018). Empirijski podaci potvrđuju ključnu ulogu GST u transportu glikozida flavonoida (Manzoor i sar., 2023).

Podfamilija proteina MRP/ABCC pripada superfamiliji ABC transportera (Klein i sar., 2006). Većina ABC gena kodira membranski vezane proteine, koji direktno učestvuju u transportu širokog spektra molekula kroz ćelijske membrane (Verrier i sar., 2008). Kod *A. thaliana*, ova superfamilija obuhvata 13 podfamilija klasifikovanih u importere, eksportere i netransportne proteine (Verrier i sar., 2008; Lane i sar., 2016). Ovi proteini funkcionišu kao vakuolarne pumpe za flavonoide i antocijane, što je potvrđeno kod vrsta *A. thaliana* (AtMRP1/2), *Z. mays* (ZmMRP3) i *Vitis vinifera* L. (VvABCC1) (Lu i sar., 1998; Goodman i sar., 2004; Francisco i sar., 2013). Mehanizam transporta zasnovan je na direktnoj hidrolizi ATP, koja indukuje konformacione promene transportera, omogućavajući translokaciju supstrata kroz membranu (Schulz i Kolukisaoglu, 2006; Francisco i sar., 2013).

Značajnu ulogu u sekvestraciji flavonoida imaju i MATE transporteri, lokalizovani na tonoplastu (Yazaki i sar., 2008). Za razliku od MRP proteina, MATE transporteri funkcionišu kao sekundarni aktivni transporteri, koristeći elektrohemijski gradijent protona (H^+) ili natrijuma (Na^+) kao pokretačku silu za unos antocijana u vakuolu (Doshi i sar., 2017).

Uspostavljanje protonskog gradijenta pomoću H^+ -ATPaza predstavlja primarnu pokretačku snagu za transport flavonoida, naročito antocijana, u vakuolu (Gomez i sar., 2009). Unutar vakuolarnog odeljka, niska pH vrednost i acilacija flavonoida ključni su za konformacione modifikacije koje omogućavaju efikasno zadržavanje ovih metabolita (Nozue i sar., 1997; Kitamura, 2006). Identifikacija acilovanih metabolita floretina u tkivima *A. thaliana* (Poglavlje 4.10) ukazuje na verovatnu translokaciju floretina na relaciji koren–izdanak i njegovu vakuolarnu sekvestraciju.

Iako su putevi usvajanja i transporta flavonoida razdvojeni, Buer i sar. (2007) navode da se ova jedinjenja često akumuliraju distalno u odnosu na mesto inicijalnog usvajanja. Na primer, naringenin i dihidrokempferol, apsorbirani u korenu ili kotiledonima transportuju se do distalnih tkiva gde se metabolizuju u kvercetin i kempferol, pri čemu su ABCC transporteri identifikovani kao ključni za ovo kretanje. Nalazi Gaucher i sar. (2013) ukazuju na to da se dihidrohalkoni, prvenstveno florizin, dominantno akumuliraju u epidermalnim slojevima listova jabuke i parenhimskim ćelijama sprovođenih snopića. Ovakva lokalizacija sugeriše da se ovi metaboliti distribuiraju putem sistema za transport na velike udaljenosti (eng. *long-distance transport*).

Uzimajući u obzir sposobnost biljaka da transportuju flavonoide iz korenovog sistema ka distalnim organima, kao i činjenicu da je floretin, usvojen isključivo putem korena, doveo do izraženog dozno-zavisnog smanjenja mase izdanaka, možemo pretpostaviti da se floretin translocira od korena ka nadzemnim delovima biljke. Ovaj dihidrohalkon u ciljnim tkivima ostvaruje svoje delovanje na ultrastrukturu mezofilnih ćelija listova, narušavajući integritet i funkcionalnost hloroplasta, što dalje dovodi do poremećaja fotosintetskih procesa i ćelijskog energetskeg statusa. Ovi efekti se reflektuju kroz inhibiciju rastanja i razvića kako nadzemnih, tako i podzemnih biljnih organa, što će biti detaljnije razmotreno u nastavku diskusije.

5.1.5. Uticaj floretina na gravitropski odgovor

Koren poseduje izraženu sposobnost prilagođavanja i usmeravanja rastenja radi zaobilaženja mehaničkih prepreka u zemljištu. Njegovu morfologiju u najvećoj meri određuju genetički faktori, kao i fizičko-hemijske karakteristike supstrata u kojem se razvija (Zhao i sar., 2015). Međutim, u određenim situacijama može doći do pojave nepravilnog rastenja korena i formiranja talasastog ili izuvijanog oblika čak i u odsustvu vidljivih mehaničkih prepreka, što se najčešće dovodi u vezu sa delovanjem različitih faktora stresa. Ovakva pojava uočena je i kod juvenilnih biljaka *A. thaliana* tretiranih floretinom i manifestovala se poremećajem gravitropskog ponašanja, značajnim smanjenjem vertikalnog gravitropskog indeksa (VGI) i pojavom deformacija u vidu talasa, petlji, oblika slova „Z” i inverzija. Talasasto rasteње korena kod *A. thaliana* prethodno je opisano u slučaju poremećaja gravitropskog odgovora izazvanog mehaničkom manipulacijom (podvezivanjem korena) (Ditengou i sar., 2008), kao i u slučaju egzogene primene jedinjenja kao što je salicilna kiselina (Pasternak i sar., 2019). U oba slučaja, došlo je do narušavanja pravilne distribucije fitohormona auksina. Christensen i saradnici (2000) ukazali su da prekomerna ekspresija proteina serin/treonin kinaze PINOID (PID) ima ključnu ulogu u regulaciji polarnog transporta auksina, prvenstveno putem fosforilacije PIN proteina (auksinskih efluks nosača). Fosforilacijom članova PIN familije, PID protein utiče na njihovu unutarćelijsku lokalizaciju u ćelijskoj membrani, odnosno apikalno-bazalnu orijentaciju. Na taj način PID protein usmerava tok auksina, formirajući morfogenetski gradijent auksina i time reguliše gravitropski odgovor, kao i proces formiranja bočnih korenova.

Taylor i saradnici (2021) ispitivali su mehanizam formiranja petlji na korenu pirinča i identifikovali histidin-kinazu 1 i auksinski transporter OsAUX1, kao ključne regulatore ovog procesa. Formiranje petlji se prirodno javlja kod biljaka koje rastu na stenovitim podlogama (Taylor i sar., 2021), a mehanizam koji stoji u osnovi ove pojave zasniva se na diferencijalnom izduživanju ćelija, slično onome koje se javlja tokom gravitropskog odgovora, gde se ćelije na jednoj strani korena izdužuju intenzivnije nego na drugoj. I druge studije povezuju pojavu petlji i deformacija korena sa poremećajima u metabolizmu auksina i narušenim gravitropskim odgovorom (Stolarz, 2009; Migliaccio i sar., 2013).

Ključnu ulogu auksina u pojavi deformacija korena potvrđuje i saznanje da inhibitori auksina kao što su 2,3,5-trijodobenzoeva kiselina (eng. *2,3,5-triiodobenzoic acid*, TIBA) i *p*-hlorfenoksiizobuterna kiselina (eng. *p-chlorophenoxyisobutyric acid*, PCIB) mogu indukovati poremećaj gravitropskog odgovora i rasteње korena u obliku petlje (Santos Wagner i sar., 2021), kao i smanjeno formiranje bočnih korenova i redukciju dužine korena (Oono i sar., 2003). Sinergističko delovanje TIBA, PCIB i drugih inhibitora auksina dovodi do poremećaja funkcije PIN1 proteina zaduženog za efluks auksina, kao i drugih PIN transportera (Muday i Murphy, 2002). PCIB, čija je hemijska struktura slična sintetičkom auksinu 4-hlorfenoksi-sirćetnoj kiselini, smatra se kompetitivnim antagonistom auksina, budući da se vezuje za auksinske receptore (McRae i Bonner, 1953; Jönsson, 1961). Osim toga, PCIB inhibira ranu ekspresiju gena uključenih u auksinski odgovor i pospešuje degradaciju Aux/IAA proteina (Oono i sar., 2003).

Sveukupno, dostupni podaci ukazuju da auksini imaju centralnu ulogu u regulaciji pravilnog rastenja i morfogeneze korena, te da narušavanje bilo koje komponente auksinske signalne mreže može dovesti do pojave strukturnih deformacija korena. Pri tom je važno istaći da morfološke promene koje su uočene kod tretmana floretinom, odgovaraju onim koje mogu biti indukovane

primenom inhibitora auksinskog transporta ili signalizacije, što jasno ukazuje na to da auksini mogu biti uključeni u mehanizam fiziološkog delovanja floretina.

5.2. ELEKTROFIZIOLOŠKA ANALIZA EFEKTA FLORETINA NA EPIDERMALNE ČELIJE KORENA

Budući da koren predstavlja primarno mesto kontakta biljke sa alelohemikalijama iz zemljišta, fiziološke promene se najpre i najintenzivnije manifestuju upravo u njegovim tkivima. Rezultati dobijeni na juvenilnim biljkama *A. thaliana* jasno su potvrdili da floretin dominantno utiče na rastenje i razviće korenovog sistema. Polazeći od tih nalaza, jedan od ciljeva ove disertacije bio je identifikacija inicijalnog odgovora korena na prisustvo floretina, što se smatra prvim korakom u mehanizmu njegove percepcije. U tu svrhu, primenom konvencionalnih intracelularnih mikroelektroda, analizirane su promene membranskog potencijala epidermalnih ćelija korena.

Jonski transport kroz membrane predstavlja jedan od najvažnijih energetske procesa, trošeći približno 30% ukupne metaboličke energije biljne ćelije. Ovaj proces je fundamentalan za gotovo sve aspekte biologije biljaka, uključujući mineralnu ishranu, ćelijsku ekspanziju, polarni transport auksina, odbrambene odgovore i proces starenja (Blatt, 2024). Kretanje jona odvija se pasivnim ili aktivnim mehanizmima. Pasivan transport se vrši niz elektrohemijski gradijent bez utroška energije, prvenstveno putem jonskih kanala, dok aktivni transport zahteva utrošak ATP kako bi jonske pumpe prevazišle gradijent koncentracije. S obzirom na to da je lipidni dvosloj nepropustljiv za većinu jona, transport je omogućen prisustvom specifičnih membranskih proteina, kao što su jonski kanali, pumpe, kotransporteri i ABC transporteri (Nešković i sar., 2003).

Kao proteini ugrađeni u lipidni dvosloj ćelijske membrane, jonski kanali funkcionišu kao strukturirane pore koje omogućavaju pasivno kretanje jona, prateći njihov elektrohemijski gradijent. Regulacija njihove aktivnosti može biti brza, pod direktnim uticajem pH i Ca^{2+} u citoplazmi, ili sporija, kada zahteva aktivaciju specifičnih posrednika poput kalmodulina, kinaza ili fosfataza radi naknadne modifikacije proteina samog kanala (Pantoja, 2021). Opšte je prihvaćeno da se usvajanje jona K^{+} odvija pasivno, zahvaljujući visokom negativnom membranskom potencijalu koji generiše aktivnost H^{+} -ATP-aze (Pantoja, 2021). Nasuprot tome, joni Na^{+} su dominantni u ekstracelularnom prostoru i teže difuziji u ćeliju. U formiranju membranskog potencijala i održavanju homeostaze učestvuju i drugi joni, prvenstveno Ca^{2+} . U uslovima depolarizacije ćelijske membrane, dolazi do naglog porasta koncentracije Ca^{2+} u citoplazmi kroz specifične jonske kanale aktivirane depolarizacijom (eng. *depolarization-activated Ca^{2+} channels*, DACC) (White, 1998). Ovi neselektivni katjonski kanali identifikovani su u različitim tipovima ćelija, uključujući ćelije korena *A. thaliana* (Thion i sar., 1998).

Jonske pumpe funkcionišu kao specifični membranski transporteri koji omogućavaju aktivni transport jona nasuprot njihovom elektrohemijskom gradijentu. Među njima su najzastupljenije protonske pumpe (H^{+} -ATPaze), čija je fundamentalna uloga uspostavljanje transmembranskog gradijenta protona (Nešković i sar., 2003). Ovi enzimi direktno sprežu energiju oslobođenu hidrolizom ATP sa transportom jona, delujući nezavisno od njihove trenutne koncentracije sa obe

strane membrane. U biljnim ćelijama, H^+ -ATPaze su primarni nosioci aktivnog transporta, usmeravajući protone iz citoplazme u apoplast ili lumen vakuole. Ovakav efluks protona rezultira značajnim snižavanjem koncentracije H^+ jona u citoplazmi, čime se generiše membranski potencijal na ćelijskoj membrani i tonoplastu. Na taj način, H^+ -ATPaze vrše konverziju hemijske energije iz fosfatnih veza u potencijalnu električnu energiju, poznatu kao protonska motorna sila (Nešković i sar., 2003).

Depolarizacija ćelijske membrane i poremećaj jonskih flukseva predstavljaju univerzalni odgovor biljke na različite abiotičke i biotičke činioce stresa, uključujući i alelohemikalije (Pang i sar., 2007; Suarez-Fernandez i sar., 2020; Ninković i sar., 2024). Neke od njih, kao što su fenolna jedinjenja poput tanina, katehina i fenolnih kiselina, primarno targetiraju integritet membranskog transporta u ćelijama korena (Erdei i sar., 1994; Keller i sar., 2008). Glass i Dunlop (1974) su pokazali da različite fenolne kiseline, primenjene u koncentraciji od 500 μ M, što je ekvivalentno koncentraciji floretina korišćenju za elektrofiziološke analize u ovoj disertaciji, indukuju brzu depolarizaciju membranskog potencijala u apikalnim ćelijama korena ječma (*Hordeum vulgare* L.). Pored toga, uočene amplitude depolarizacije značajno su varirale u zavisnosti od hemijske strukture primenjene fenolne kiseline, kao i od njene koncentracije.

Elektrofiziološke analize pokazale su da floretin deluje neposredno nakon primene, izazivajući izraženu depolarizaciju membrane epidermalnih ćelija korena *A. thaliana*. U saglasnosti sa nalazima Glass i Dunlop (1974), rezultati ove disertacije, na osnovu jasno izražene dozno-zavisne tendencije membranskog odgovora na floretin, potvrđuju da je amplituda promene membranskog potencijala direktno uslovljena koncentracijom ispitivanog jedinjenja. Štaviše, značajne razlike u efektivnim koncentracijama između strukturno srodnih molekula, poput floretina i (*E*)-halkona (Díaz-Tielas i sar., 2017), ukazuju na visok stepen specifičnosti interakcija između alelohemikalija i membranskih komponenti uključenih u regulaciju jonskog transporta kod *A. thaliana*. Zabeležena depolarizacija može biti direktna manifestacija inaktivacije H^+ -ATPaze ili poremećaja jonskih flukseva, primarno povećanog protoka Na^+ i K^+ , praćenog naglim porastom koncentracije Ca^{2+} u citoplazmi (Hedrich, 2012; Pantoja, 2021). Poznato je da pojedine alelohemikalije, poput juglona, sorgoleona i kurkuminoida, ispoljavaju fitotoksičnost direktnom inhibicijom membranske H^+ -ATPaze, što rezultira narušavanjem membranskog potencijala i posledičnom inhibicijom rastenja akceptorske biljke (Hejl i Koster, 2004a, b; Dao i sar., 2016). Ovakva promena je posledica redukovanog efluksa protona posredovanog H^+ -ATPazom, čime se kompromituje protonska motorna sila neophodna za rad sekundarnih transportera (Falhof i sar., 2016). S obzirom na to da postoji strukturna sličnost i sličan spektar bioaktivnosti, moguće je da floretin, kao i određeni flavonoidi (Adinortey i sar., 2018; Ontiveros i sar., 2019), direktno utiče na aktivnost H^+ -ATPaze, dovodeći do depolarizacije membrane i promena jonskih flukseva. Ovakav poremećaj membranskog transporta može da služi kao primarni signalni okidač za aktivaciju kaskadnih puteva odgovornih za inhibiciju rastenja, fiziološke promene i programiranu ćelijsku smrt (Demidchik i sar., 2014).

5.3. ANALIZA HISTOLOŠKIH PROMENA NA KORENU JUVENILNIH BILJAKA IZAZVANIH FLORETINOM

5.3.1. Efekat floretina na histološku organizaciju korena

Inhibicija rastanja korena u prisustvu alelohemikalija često je povezana sa strukturnim promenama u tkivima korena (Burgos i sar., 2004; Gniazdowska i Bogatek, 2005; Pereira i sar., 2017). Prethodna istraživanja pokazala su da alelohemikalije mogu veoma intenzivno poremetiti histološku organizaciju korena, čak do te mere da onemoguće jasno razlikovanje tipova ćelija (Cruz-Ortega i sar., 1998; Burgos i sar., 2004).

Rezultati histološke analize ukazuju na to da je floretin značajno narušio strukturnu organizaciju ćelija korenove kape juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Najizraženije histološke i morfološke aberacije uočene su nakon deset dana tretmana u zoni kolumele i apikalnom regionu korenove kape, gde su uočeni višeslojni kompleksi hipertrofiranih ćelija nepravilne morfologije i izražene strukturne dezorganizacije. Njihova separacija od bazalnih slojeva kolumele ukazuje na intenzivirane procese rane senescencije i ćelijske smrti, što svedoči o ozbiljnom narušavanju integriteta ovog zaštitno-senzornog tkiva. Zapažene promene u skladu su sa nalazima drugih istraživača koji su pokazali da su najčešće mete alelohemikalija upravo ćelije korenove kape (Burgos i sar., 2004; Pereira i sar., 2017) i apikalnog meristema korena (Soltys i sar., 2011, 2012; Araniti i sar., 2017; Zhang i sar., 2018b). Tako na primer, četvorodnevno izlaganje klijanaca krastavca (*Cucumis sativus* L.) alelohemikalijama iz raži (*Secale cereale* M.Bieb.), benzoksazin-2(3H)-onu (BOA) i 2,4-dihidroksi-1,4-benzoksazin-3-onu (DIBOA), dovelo je do raslojavanja ćelija između korenove kape i apikalnog meristema korena (kod krastavca se u normalnim slučajevima ove dve zone korena ne razlikuju) (Burgos i sar., 2004). Takođe, Cruz-Ortega i saradnici (1998) su pokazali da tkiva korena pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.) i tikve (*Cucurbita ficifolia* Bouché) izložena ekstraktu iz listova korovske vrste *Sicyos deppei* G. Don postaju dezorganizovana, uz kompresovan raspored ćelija oko mirujućeg centra i nepravilan raspored statolita. Slične promene primećene su u korenovoj kapi juvenilnih biljaka *A. thaliana* nakon sedmodnevnog izlaganja isparljivom seskviterpenoidnom jedinjenju farnezena, uz skraćanje meristemske zone i narušenu distribuciju auksina (Araniti i sar., 2017). Veoma slična zapažanja proističu iz histološke analize apikalnog dela korena biljaka *A. thaliana* tretiranih floretinom, koja ukazuje na narušavanje strukturne organizacije korenove kape i značajno skraćanje meristemske i elongacione zone apikalnog korena. Ove pojave mogu biti posledica prevremenog prestanka ćelijskih deoba i započinjanja rane senescencije, na šta ukazuje i delimično odvajanje epidermalnih ćelija od kortikalnog sloja u meristenskoj i elongacionoj zoni.

Posmatrano u celini, dobijeni rezultati sugerišu da floretin narušava strukturni i funkcionalni integritet apikalnog dela korena *A. thaliana* i da deluje naročito na tkiva gde se odvija intenzivna ćelijska deoba i elongacija. Na taj način on funkcioniše kao potentan modulator rastanja, remeteći koordinaciju između ćelijske deobe, elongacije i diferencijacije u korenovom vrhu, čime dugoročno kompromituje razviće juvenilnih biljaka *A. thaliana*.

Strukturna oštećenja uočena na korenu juvenilnih biljaka *A. thaliana* tretiranih floretinom donekle podsećaju na simptome „bolesti presađivanja jabuke” (eng. *Apple Replant Disease*, ARD), oboljenja koje se javlja pri sadnji jabuke na zemljištima na kojima su prethodno gajeni zasadi jabuke. Kod korenova *A. thaliana*, kao i u slučaju korenova sadnica jabuke obolelih od ARD, javljaju se usporeno rastenje, svetlo braon obojen korenov sistem i oštećenja epidermalnih ćelija korena koje se

odvajaju od kortikalnog sloja u meristenskoj i elongacionoj zoni korena (Yim i sar., 2013; Winkelmann i sar., 2019). Iako se smatra da je etiologija ARD multifaktorska (Winkelmann i sar., 2019), dostupni podaci ukazuju na to da uloga floretina u razvoju i ispoljavanju simptoma ove bolesti verovatno nije zanemarljiva. Stoga, razumevanje načina delovanja floretina na model-biljci *A. thaliana* može doprineti dubljem uvidu u mehanizme koji stoje u osnovi ARD.

Ključna uloga auksina u modulaciji formiranja i održavanja meristemske zone korena je neosporna. Pokazano je da egzogena primena sintetičkih analoga auksina kao što je 2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4-D), može značajno smanjiti veličinu meristema korena i dovesti do usporenog rastenja korena juvenilnih biljaka *A. thaliana* (Růžicka i sar., 2009; Filin i Ivanov, 2016). Navedeni autori objašnjavaju da 2,4-D ostvaruje zapažene efekte ne samo putem usporavanja ćelijskih deoba u meristemu, već i inhibicijom izduživanja ćelija korena u zoni elongacije.

Mnogi spoljašnji činioci mogu uticati na skraćenje meristemske i elongacione zone inhibirajući ćelijske deobe i izduživanje ćelija posredstvom auksina. Tako je, na primer, alkalni stres stimulisao akumulaciju auksina u apeksu korena, suprimirajući deobe ćelija i smanjujući njihov broj (Li i sar., 2015). Primena visokih koncentracija salicilne kiseline (3 – 200 μ M) dovela je do akumulacije auksina u epidermisu elongacione zone, što je rezultiralo inhibicijom elongacije i usporenim rastenjem korena *A. thaliana* (Pasternak i sar., 2019). Slični efekti zabeleženi su i pri tretmanu alelohemikalijama kao što je benzoeva kiselina. Primena ovog jedinjenja u koncentracijama od 50 – 300 mM dovela je do inhibicije rastenja primarnog korena i poremećaja njegovog gravitropskog odgovora, kako kod monokotiledonih vrsta kao što su pirinač (*Oryza sativa* L.) i kukuruz (*Zea mays* L.), tako i kod dikotiledonih vrsta kao što su *A. thaliana*, kikiriki (*Arachis hypogaea* L.) i lucerka (*Medicago sativa* L.) (Zhang i sar., 2018b). Zapažena inhibicija nastala je kao posledica skraćanja meristemske i elongacione zone i smanjenja broja meristemskih ćelija usled poremećaja metabolizma auksina. U osnovi ovih promena leži akumulacija auksina u vrhovima korena, kao posledica povećane ekspresije gena *AUX1* i *PIN2*, uključenih u biosintezu i polarni transport auksina.

Imajući u vidu ključnu ulogu auksina u regulaciji ćelijskog ciklusa i elongacije ćelija, kao i činjenicu da su kod juvenilnih biljaka vrste *A. thaliana* tretiranih floretinom uočeni skraćenje meristemske i elongacione zone korena, deformacije korena i gubitak pravilnog gravitropskog odgovora, te sličnost ovih efekata sa simptomima izazvanim auksinskim herbicidima poput 2,4-D, postavljena je i eksperimentalno ispitana pretpostavka da izmenjena homeostaza auksina predstavlja jedan od ključnih mehanizama delovanja floretina. Diskusija dobijenih rezultata u ovom kontekstu izložena je u Poglavlju 5.6.

5.3.2. Efekat floretina na veličinu i distribuciju amiloplasta u ćelijama kolumele

Skrob predstavlja primarni vid deponovanja metaboličke energije u biljnim tkivima, a njegova biosinteza odvija se u plastidima (hloroplastima i amiloplastima). Funkcionalna uloga skrobnih zrna varira u zavisnosti od tipa tkiva. Skrob koji se tokom dana sintetiše u listovima direktan je produkt fotosinteze i podleže degradaciji tokom noći, obezbeđujući neophodne supstrate za održavanje metabolizma i biosintetske procese u odsustvu svetlosti (Pfister i Zeeman, 2016). Nasuprot tome,

skrobna zrna u vrhovima korena funkcionišu kao dugoročne rezerve i imaju esencijalnu ulogu u mehanorecepciji, odnosno inicijalnim koracima percepcije gravitropskog stimulusa (Baldwin i sar., 2013).

U ćelijama kolumele korena, rezerve skroba lokalizovane su u amiloplastima, specijalizovanim organelama koje funkcionišu kao statoliti. Tokom gravitropske reakcije korena, sedimentacija amiloplasta inicira signalnu kaskadu, uključujući promene u koncentraciji Ca^{2+} , pH vrednosti i membranskom potencijalu, što dovodi do promene polariteta PIN transportera i asimetrične redistribucije auksina. Akumulacija auksina u elongacionoj zoni na jednoj strani korena rezultuje inhibicijom elongacije ćelija te strane, dok se na suprotnoj strani, gde je koncentracija auksina snižena, elongacija ćelija relativno povećava. Ovakva diferencijalna regulacija rasteња omogućava usmereno savijanje korena u pravcu gravitacione sile (Baldwin i sar., 2013).

Poznato je da deficit skroba kod specifičnih mutanata *A. thaliana* (Caspar i sar., 1989; Kiss i sar., 1989), kao i fizička eliminacija ćelija kolumele (Blancaflor i sar., 1998; Tsugeki i Fedoroff, 1999), dovode do izrazitog slabljenja gravitropskog odgovora. Ovi nalazi potvrđuju da je sedimentacija amiloplasta u ćelijama kolumele ključna za percepciju gravitacionog stimulusa (Baldwin i sar., 2013).

Kao što je prikazano u Poglavlju 5.1.5, tretman floretinom indukovao je izražen agravitropski fenotip kod juvenilnih biljaka *A. thaliana*, praćen pojavom razvojnih deformacija i značajnim smanjenjem vertikalnog gravitropskog indeksa (VGI). Rezultati histološke analize, kao i bojenja skrobnih zrna Lugolovim reagensom, kod biljaka tretiranih 500 μM floretinom potvrdili su da je u osnovi uočenog agravitropskog ponašanja značajna redukcija sadržaja skroba u ćelijama kolumele. Amiloplasti tretiranih biljaka bili su znatno manjih dimenzija i prisutni u manjem broju u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Ovi rezultati ukazuju na to da floretin narušava gravitacionu percepciju u korenu, delimično putem sprečavanja pravilne sedimentacije amiloplasta u ćelijama kolumele, čime se remeti inicijalna faza gravitropskog signalnog odgovora. Ovakav efekat je uporediv sa delovanjem drugih alelohemikalija, poput narciklazina iz lukovica narcisa (*Narcissus tazetta* L.) i artemisinina iz slatkog pelina (*Artemisia annua* L.), koje onemogućavaju percepciju gravitropskog stimulusa u korenovima *A. thaliana* putem smanjenja sadržaja skroba u ćelijama kolumele (Na i sar., 2011; Yan i sar., 2018).

5.4. ANALIZA PROMENA U ULTRASTRUKTURI MEZOFILNIH ĆELIJA LISTOVA *A. thaliana* IZAZVANIH FLORETINOM

Rezultati analize ultrastrukturne organizacije ćelija mezofila listova juvenilnih biljaka *A. thaliana* izloženih tretmanu 500 μM floretinom jasno ukazuju da ova supstanca izaziva značajna oštećenja koja postaju izraženija sa trajanjem tretmana. Jedan od najranijih znakova delovanja floretina, uočen nakon desetodnevnog tretmana, bila je retrakcija protoplasta, odnosno njegovo odvajanje od ćelijskog zida i povlačenje ka centralnom delu ćelije. Kacprzyk i saradnici (2017) naglašavaju da retrakcija protoplasta često može prethoditi gubitku integriteta ćelijske membrane, što kasnije vodi do programirane ćelijske smrti. U osnovi ovog mehanizma leži priliv jona Ca^{2+} , koji

ubrzava proces ćelijske smrti (Kacprzyk i sar., 2017). Dodatno, tretman floretinom je izazvao pojavu neravnomerne granulacije citoplazme i selektivno ugrozio funkcionalni integritet mezofilnih ćelija, narušavajući organizaciju tilakoidnog sistema hloroplasta uz pojavu specifičnih lezija.

Slična oštećenja ćelijske ultrastrukture primećena su nakon delovanja bioaktivnih supstanci biljnog porekla, etarskih ulja ili eksudata korena pojedinih alelopatičkih vrsta. Tako je, na primer, egzogena primena aromatičnog jedinjenja N-fenil-2-naftilamina dovela do brojnih ultrastrukturnih promena kod jednoćelijske alge *Chlorella vulgaris* Beijerinck. Zapažene promene su obuhvatale odvajanje membrane od ćelijskog zida, pojavu nepravilno granulirane citoplazme visoke elektronske gustine i narušenu strukturu hloroplasta (Qian i sar., 2009). Etarsko ulje mirisne lobode (*Chenopodium ambrosioides* L.) i njegove dve glavne komponente (α -terpinen i cimen) ispoljili su izražen uticaj na ultrastrukturu hloroplasta u listovima klijanaca boba (*Vicia faba* L.) (Ade Lu Ji i sar., 2018). Hloroplasti tretiranih klijanaca imali su dezorganizovanu strukturu grana tilakoida, sa nabrekli i oštećenim membranama. Slično tome, eksudati korena kamenjarske lobode (*Chenopodium murale* L.) izazvali su značajne promene u organizaciji i distribuciji hloroplasta u listovima klijanaca pšenice (*Triticum aestivum* L.) (Mitić i sar., 2018).

Hloroplasti su esencijalne organele odgovorne za proces fotosinteze, ali istovremeno predstavljaju primarno mesto nastanka ROS (Sharma i sar., 2022). Oni su takođe uključeni u percepciju i prenos signala stresa ka drugim ćelijskim organelama (Brunkard i Burch-Smith, 2018; Dogra i sar., 2018). Upravo zbog toga ultrastruktura hloroplasta se smatra pouzdanim markerom stresa kod biljaka izloženih abiotičkim i biotičkim činiocima stresa poput povećanog saliniteta, visoke temperature, zabarivanja, delovanja teških metala i ozona (Xu i sar., 2006; Zechmann, 2019; Prasetya i sar., 2022; Sharma i sar., 2022; Xu i sar., 2022; Zahra i sar., 2022).

U unutrašnjosti hloroplasta se nalazi stroma u koju je uronjen tilakoidni sistem sastavljen od spljoštenih membranskih struktura. U ovom membranskom sistemu odvijaju se svetlosno zavisne reakcije fotosinteze, koje obezbeđuju ATP i NADPH neophodne za fiksaciju CO₂ u Calvin-Bensonovom ciklusu (Nelson i Ben-Shem, 2004). Iako tilakoidni sistem poseduje određeni stepen plastičnosti koji omogućava prilagođavanje promenama u okruženju, poremećaji njegove strukture mogu značajno umanjiti efikasnost fotosinteze ili je u potpunosti onemogućiti. Takvi poremećaji dovode do smanjene asimilacije CO₂ i sekundarne inhibicije rastanja biljaka (Takahashi i Murata, 2008), kao što je to slučaj kod juvenilnih biljaka *A. thaliana* već nakon deset dana tretmana floretinom.

Produženo izlaganje floretinu (28 dana) dovelo je do izraženih ultrastrukturnih promena u mezofilnim ćelijama juvenilnih biljaka *A. thaliana*, koje su obuhvatale modifikacije ćelijskog zida, dezorganizaciju ćelijskih organela i gotovo potpuno iscrpljivanje rezervi skroba. Istovremeno, prisustvo pro-apoptotičnih ćelija i intenzivna pojava mikro- i makroautofagije ukazuju na to da floretin može pokrenuti procese ćelijske degeneracije i aktivirati mehanizme ćelijske smrti u mezofilnom tkivu.

Mehanička svojstva biljnih tkiva u najvećoj meri zavise od strukture i sastava ćelijskih zidova. Ćelijski zidovi fotosintetskih ćelija izgrađeni su od trodimenzionalne, međusobno isprepletane mreže celuloznih mikrofibrila ugrađenih u kompleksnu matricu pektina, heterogenih hemiceluloza (ksilani, manani i ksiloglukani) i strukturnih proteina (Carpita i Gibeaut, 1993, Chanliaud i sar., 2002). Promene u sastavu i organizaciji ćelijskog zida predstavljaju jedan od pouzdanih indikatora stresa kod biljaka. Različiti činioci stresa mogu dovesti do degradacije pektina ili drugih komponenti

ćelijskog zida, kao i do narušavanja vodoničnih veza između strukturnih molekula, što za posledicu ima reorganizaciju celulozne i hemicelulozne mreže i omekšavanje ćelijskog zida (Chanliaud i sar., 2002). U tom kontekstu, uočena izuvijanost ćelijskih zidova i nepravilan oblik mezofilnih ćelija u listovima juvenilnih biljaka *A. thaliana* tretiranih floretinom, najverovatnije su direktna posledica narušene arhitekture celulozno-hemicelulozne mreže ćelijskog zida.

Tretman floretinom doveo je i do pojave abnormalnog zadebljanja ćelijskih zidova kod pojedinih ćelija mezofila, koje u nekim delovima poprimaju izgled nazubljenosti. Separacija slojeva u okviru ćelijskog zida dovodi do proširenja međuslojnog prostora, što se na mikrografijama može uočiti kao zadebljanje (Nešković i sar., 2003). Nakon toga sledi reorganizacija strukturnih komponenti i ponovno uspostavljanje veza radi popunjavanja praznina, što često rezultira atipičnom morfologijom ćelijskog zida u vidu nazubljenosti. U tom slučaju, sekundarni zid raste ka unutrašnjosti ćelije, zbog čega su nazubljenja na mikrografijama orijentisana prema ćelijskoj unutrašnjosti. Takođe je poznato da smanjenje sadržaja celuloze indukovano stresom može biti kompenzovano pojačanom akumulacijom pektina, što rezultira zadebljanjem ćelijskog zida (Burton i sar., 2000). Slične promene u strukturi ćelijskog zida uočene su i nakon primene pojedinih komercijalnih herbicida. Tako su ćelije pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.) i luka (*Allium cepa* L.) tretirane nitrilnim herbicidom dihlubenilom (García-Angulo i sar., 2009) ispoljile strukturne anomalije uporedive sa onima uočenim u ćelijama mezofila *A. thaliana* nakon tretmana floretinom. Ove promene su pripisane zameni celulozno–ksiloglukanske mreže debelim slojem polisaharida pektinske prirode. Slično zadebljanje ćelijskog zida zabeleženo je i u ćelijama korena *A. thaliana* izloženim citralu (Graña i sar., 2013), kao i u ćelijama lista i korena juvenilnih biljaka pšenice (*Triticum aestivum* L.) nakon tretmana eksudatom korena *C. murale* (Mitić i sar., 2018).

Nedavne studije ukazuju i na ključnu ulogu ćelijskog zida u regulaciji provodljivosti CO₂ i efikasnosti fotosinteze u ćelijama mezofila (Flexas i sar., 2021). Naime, ćelijski zid fotosintetskih ćelija predstavlja difuzionu barijeru za molekule CO₂, te njegovo zadebljanje smanjuje njihovu provodljivost, a samim tim i intenzitet fotosinteze. Na ovaj način, zadebljanje ćelijskih zidova izazvano floretinom u velikoj meri doprinosi inhibiciji fotosinteze i povezanih metaboličkih procesa u mezofilnim ćelijama *A. thaliana*, što rezultira njihovim izgladnjivanjem i smanjenjem (nakon 10 dana) ili potpunom redukcijom rezervi skroba (nakon 28 dana).

U fotosintetskim tkivima mladih biljaka, skrob se akumulira u vidu skrobnih zrna unutar hloroplasta kotiledona i listova (Ball i Morell, 2003). Broj i zapremina skrobnih zrna strogo su regulisani i zavise od razvojnog stadijuma lista i njegovog metaboličkog statusa (Crumpton-Taylor i sar., 2012). Pored svoje osnovne funkcije u skladištenju energije, skrob u hloroplastima ima značajnu ulogu u modulisanju odgovora biljaka na biotički i abiotički stres. U nepovoljnim uslovima, biljke razgrađuju skrob kako bi obezbedile energiju i ugljenik u situacijama kada je fotosinteza kompromitovana. Oslobođeni molekuli glukoze podržavaju rastenje biljaka pod stresom i deluju kao osmoprotektanti, ublažavajući negativne efekte stresa (Krasensky i Jonak, 2012). Glukoza i saharoza takođe funkcionišu kao signalni molekuli koji unakrsno deluju sa ABA-zavisnim signalnim putevima, aktivirajući nizvodne komponente u kaskadi odgovora na stres (Rook i sar., 2006). Većina studija izveštava o smanjenju rezervi skroba u listovima različitih biljnih vrsta kao odgovoru na abiotičke činioce stresa (Thalmann i Santelia, 2017). Rezultati ove doktorske disertacije sugerišu da stres izazvan kratkotrajnim tretmanom floretinom (10 dana) dovodi do smanjenja broja i veličine skrobnih zrna u mezofilnim ćelijama *A. thaliana*, kao posledica poremećaja fotosintetske aktivnosti usled strukturnih oštećenja hloroplasta. Produženo izlaganje floretinu (28 dana), daljim narušavanjem

fotosintetičkih i drugih ćelijskih struktura, sprečava mogućnost za biosintezu skroba, vodi ka razgradnji preostalih skrobnih zrna i uvodi ćeliju u fazu gladovanja praćenu pojavom mikro- i makroautofagije.

Autofagija predstavlja univerzalni proces degradacije i reciklaže makromolekula i oštećenih ćelijskih komponenti u litičkoj organeli – vakuoli, čime se obezbeđuju hranljive materije neophodne za održavanje ćelijske homeostaze i *de novo* sintezu ćelijskih struktura. Ovaj proces učestvuje u različitim razvojnim fazama biljke i funkcioniše kao mehanizam kontrole kvaliteta u normalnim fiziološkim uslovima, čak i u odsustvu stresa (Shy i sar., 2001; Inoue i sar., 2006). Međutim, brojni činioci stresa poput gladovanja, oksidativnog stresa, povišene temperature, suše, slanog i osmotskog stresa i starenja, mogu indukovati pojavu autofagije u biljnim ćelijama (Avin-Wittenberg, 2019).

Autofagija izazvana gladovanjem je detaljno dokumentovana u ćelijama *A. thaliana* (Rose i sar., 2006; Goto-Yamada i sar., 2019). Aktivacijom autofagije, biljne ćelije nastoje da očuvaju homeostazu u uslovima ograničene dostupnosti hranljivih materija, obezbeđujući šećere, aminokiseline i masne kiseline kao supstrate za anaboličke procese ili proizvodnju energije (Masclaux-Daubresse i sar., 2017; Hirota i sar., 2018). Dostupnost glukoze i glukozo-6-fosfata direktno utiče na regulaciju autofagije putem energetske senzora SnRK1/AMPK (eng. *AMP-dependent protein kinase*) i TOR kinaza, čime je autofagija indirektno povezana sa nutritivnim i energetskim statusom ćelije. Istovremeno, autofagija doprinosi regulaciji sadržaja hranljivih materija kroz reciklažu ćelijskih komponenti (Janse van Rensburg i sar., 2019). Pored toga, mikroautofagija ima značajnu ulogu u razgradnji skroba u listovima tokom noći, pri čemu vakuola direktno zahvata male strukture nalik skrobnim zrnima (eng. *small starch granule-like structure*) lokalizovane izvan hloroplasta i transportuje ih u vakuolu radi daljeg razlaganja (Wang i sar., 2013). Postoji mogućnost da sličan mehanizam razgradnje preostalih rezervi skroba putem opisanog procesa mikroautofagije postoji i u ćelijama juvenilnih biljaka *A. thaliana* izloženih produženom tretmanu floretinom (28 dana).

Za razliku od mikroautofagije, makroautofagija se ultrastrukturno prepoznaje po prisustvu dvomembranskih vezikula – autofagozoma – i rezidualnih tela sličnih mijelinu, kao sastavnih delova litičkog odeljka ćelije. Spajanjem spoljašnje membrane autofagozoma sa tonoplastom, autofagično telo se oslobađa u vakuolarni lumen, gde se dalje razgrađuje, omogućavajući reciklažu njegovog sadržaja (Li i Vierstra, 2012). U pojedinim slučajevima, nepotpuna degradacija sadržaja autofagozoma dovodi do formiranja rezidualnih tela sličnih mijelinu, koja se sastoje od koncentričnih ili koaksijalnih membrana sa homogenim materijalom između njih (Papini i sar., 1999; Belyavskaya, 2004). Upravo prisustvo krupnih vezikula ispunjenih gustim multilamelarnim strukturama, morfološki sličnih mijelinskim rezidualnim telima, ukazuje na intenzivnu degradaciju oštećenih ćelijskih komponenti procesom makroautofagije u ćelijama koje su pretrpele intenzivna oštećenja delovanjem floretina.

Novije studije su pokazale da autofagija ne doprinosi isključivo preživljavanju ćelija u stresnim uslovima, već može imati i ulogu u promovisanju programirane ćelijske smrti (Barany i sar., 2018). Na mikrofografijama mezofilnih ćelija listova *A. thaliana* tretiranih floretinom, primećen je izvestan broj ćelija sa dezorganizovanim organelama i piknotičnim jedrima, što može ukazivati na inicijalnu fazu programirane ćelijske smrti.

Rezultati analize ultrastrukturnih karakteristika mezofilnih ćelija ukazuju da delovanje floretina inicira oštećenja hloroplasta i destabilizaciju fotosintetskog aparata, što dovodi do smanjenja

rezervi skroba i metaboličkog „gladovanja” ćelija. Kao odgovor na ovaj energetski stres, aktiviraju se adaptivni procesi autofagije, uključujući mikro- i makroautofagiju, usmereni ka održavanju homeostaze i preživljavanju mezofilnog tkiva. Ovi rezultati potvrđuju da primarni cilj floretina predstavlja fotosintetski sistem hloroplasta, čije narušavanje značajno utiče na metaboličku stabilnost ćelija i posledično doprinosi fenotipskim efektima na rastenje i razviće biljaka.

5.5. UTICAJ FLORETINA NA KONCENTRACIJU FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

S obzirom na izražene ultrastrukturne promene u hloroplastima juvenilnih biljaka *A. thaliana* uočene nakon tretmana floretinom, analizirana je i koncentracija fotosintetskih pigmenata u lisnim rozetama kontrolnih i tretiranih biljaka. Rezultati su pokazali da je tretman floretinom doveo ne samo do promene ukupne koncentracije pigmenata, već i do poremećaja njihovog međusobnog odnosa, što ukazuje na narušavanje funkcionalne organizacije fotosintetskog aparata.

Hlorofili predstavljaju ključne fotosintetske pigmente koji su lokalizovani u hloroplastima biljnih ćelija. S obzirom na to da hlorofili neposredno učestvuju u apsorpciji sunčeve energije, njihova količina u listovima pruža pouzdane informacije o fiziološkom stanju listova i opštem stanju biljke. U poređenju sa drugim pigmentima, hlorofili su naročito osetljivi na promene u spoljašnjoj sredini, zbog čega se smatraju pouzdanim indikatorima stresa (Talebzadeh i Valeo, 2021). Njihova količina direktno određuje intenzitet fotosintetske aktivnosti, a samim tim i količinu fotosintata i energije potrebne za akumulaciju biomase. Stoga, degradacija hlorofila predstavlja tipičnu posledicu izloženosti biljaka abiotičkim činiocima stresa poput povišenog saliniteta, visoke temperature ili suše (Araus i sar., 1998; Fracheboud i sar., 2004; Kannan i Kulandaivelu, 2011; Reda i Mandoura, 2011; Khaleghi i sar., 2012; Taïbi i sar., 2016).

U skladu sa uočenim ultrastrukturnim oštećenjima hloroplasta i poremećajima u organizaciji i funkcionalnosti tilakoidnog sistema mezofilnih ćelija juvenilnih biljaka *A. thaliana* izloženih floretinu, zapaženo je i značajno sniženje koncentracije hlorofila *a* i *b* u listovima tretiranih biljaka. Do redukcije količine hlorofila može doći usled inhibicije njihove biosinteze ili aktivacije degradacionih puteva. Inhibicija biosinteze hlorofila često je povezana sa inaktivacijom enzima uključenih u sintezu 5-aminolevulinske kiseline i porfirina (Tewari i Tripathy, 1998; Mohanty i sar., 2006). S druge strane, oštećenja tilakoidnih membrana usled delovanja stresa, dovode do oslobađanja hlorofila i do njegove ubrzane degradacije, kako bi se sprečilo oštećenje ćelija (Takamiya i sar., 2000). U degradacionom procesu, značajnu ulogu imaju enzimi poput feofitinaze, lokalizovane u plastidima (Schelbert i sar., 2009), kao i hlorofilaze iz tilakoidne membrane hloroplasta (Takamiya i sar., 2000; Kariola i sar., 2005). Iako je poznato da brojne alelohemikalije, poput juglona, benzoeeve i cimetne kiseline, prvenstveno deluju preko smanjenja količine hlorofila *a* u listovima (Baziramakenga i sar., 1994; Topal i sar., 2007), pokazano je da floretin indukuje izraženije sniženje koncentracije hlorofila *b* u odnosu na hlorofil *a*, što dovodi do povećanja njihovog odnosa (*a/b*) u odnosu na kontrolu. Jedno od mogućih objašnjenja ove pojave je činjenica da se tokom procesa

degradacije, hlorofil *b* može konvertovati u hlorofil *a* (Ito i sar., 1996; Ohtsuka i sar., 1997), što dovodi do bržeg opadanja koncentracije hlorofila *b* i povećanja odnosa ovih hlorofila (*a/b*).

Karotenoidi su multifunkcionalni pigmenti koji imaju ključnu ulogu u fotosintezi i zaštiti fotosintetskog aparata. Ksantofili, poput violaksantina, luteina i zeaksantina, povezani su sa proteinskim komponentama antena kompleksa fotosistema PSI i sprečavaju oštećenja izazvana viškom svetlosne energije njenom disipacijom u vidu toplote kroz ciklus ksantofila (Josue i Frank, 2002). Gašenjem tripletnog hlorofila sprečava se formiranje singletnog kiseonika (koji se formira u direktnoj interakciji tripletnog hlorofila i tripletnog *ground-state* kiseonika), dok deekscitacija singletnih pobuđenih stanja hlorofila omogućava disipaciju viška apsorbirane energije i sprečava formiranje superoksid anjon radikala $O_2^{\cdot -}$ (Demmig-Adams i Adams, 2002). Tokom produženog tretmana floretinom uočeno je povećanje koncentracije karotenoida i smanjenje odnosa hlorofili/karotenoidi, što se smatra pouzdanim pokazateljem senescencije, stresa ili oštećenja fotosintetskog aparata (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

Indirektni pokazatelji, poput narušene strukture hloroplasta, smanjene koncentracije hlorofila, kao i izmenjenog odnosa hlorofila i karotenoida, sugerišu da floretin može inhibirati fotosintezu kod juvenilnih biljaka *A. thaliana*. Može se pretpostaviti da ograničena sinteza ugljenih hidrata usled redukovane koncentracije hlorofila smanjuje količinu dostupne energije za metaboličke procese, ali i ugljeničnih skeleta, što verovatno doprinosi izraženoj inhibiciji rastenja juvenilnih biljaka.

5.6. UTICAJ FLORETINA NA SADRŽAJ I DISTRIBUCIJU AUKSINA

5.6.1. Uticaj floretina na sadržaj auksina i auksinskih metabolita

Auksini predstavljaju centralne regulatore rastenja i razvića, čija je uloga presudna u gotovo svim aspektima života biljaka, od embriogeneze i uspostavljanja polarne organizacije, pa sve do odgovora na gravitacione i svetlosne stimuluse. S obzirom na to da ovi fitohormoni upravljaju finom koordinacijom deobe, elongacije i diferencijacije ćelija, održavanje njihove homeostaze je od suštinskog značaja za normalno funkcionisanje biljnog organizma. Svaki spoljašnji uticaj, uključujući egzogenu primenu supstanci koje interferiraju sa metabolizmom, transportom ili signalizacijom auksina, neizbežno dovodi do narušavanja hormonske ravnoteže. Ovakav disbalans se ne odražava samo na sadržaj auksina, već inicira kompleksnu kaskadu promena u celokupnom fitohormonskom profilu biljke. Posledice ovih procesa manifestuju se kroz drastične izmene u morfogenezi, narušavanje integriteta tkiva i promenu funkcionalnog odgovora biljke, što u krajnjem ishodu može ozbiljno ograničiti njen adaptivni potencijal i preživljavanje u uslovima stresa.

Rezultati analize sadržaja osnovnog, biološki aktivnog oblika auksina – indol-3-sirćetne kiseline (IAA), kao i devet ključnih auksinskih metabolita uključenih u puteve biosinteze, razgradnje i skladištenja IAA, u juvenilnim biljkama *A. thaliana* tretiranim 500 μ M floretinom, ukazali su na značajno narušavanje auksinske homeostaze. Sadržaj IAA u korenu značajno se povećao nakon izlaganja floretinu, pri čemu je zabeleženo približno dvostruko, odnosno trostruko povećanje njegove koncentracije nakon dvočasovnog (124,8%) i šestočasovnog tretmana (220,7%).

Kao što je ranije istaknuto (Poglavlje 5.3.1), brojne alelohemikalije mogu inhibirati rastenje korena putem supresije deoba ćelija meristemske zone, odnosno elongacije ćelija korena, direktnom stimulacijom akumulacije IAA u vrhovima korena. Ova zapažanja su potvrđena egzogenom primenom auksina koja je praćena njegovom intenzivnom akumulacijom u tretiranim biljkama. Pokazano je da tretman klijanaca *A. thaliana* sa IAA u koncentracijama višim od 100 nM izaziva dozno-zavisnu inhibiciju rastenja primarnog korena (Yang i sar., 2021). Takođe, sintetički auksini 1-naftalensirćetna kiselina (NAA) i 2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4-D) dovode do smanjenja veličine meristemske zone i supresije rastenja primarnog korena pri koncentracijama višim od 50 nM, odnosno 20 nM (Růžicka i sar., 2009). U tom kontekstu, zabeleženo povećanje sadržaja IAA u korenu biljaka tretiranih floretinom može predstavljati jedan od ključnih mehanizama koji stoje u osnovi inhibicije rastenja korena i razvoja morfoloških promena uočenih kod tretiranih biljaka.

Brojne studije su pokazale da stresni činioci, poput povišenog saliniteta ili osmotskog stresa, utiču ne samo na koncentraciju slobodne IAA, već i na sadržaj njenih prekursora, konjugata i produkata razgradnje u biljnim tkivima (Pavlović i sar., 2018; Smolko i sar., 2021). U skladu sa tim, rezultati ove disertacije pokazali su da je tretman juvenilnih biljaka *A. thaliana* 500 µM floretinom doveo do izrazitog smanjenja sadržaja gotovo svih prekursora IAA u korenu (antranilata (ANT), triptofana (TRP), triptamina (TRA), indol-3-pirogroždane kiseline (IPyA) i indol-3-acetonitrila (IAN)), izuzev indol-3-acetamida (IAM). Pri tome je naročito izražen i brz pad nivoa IAN zabeležen neposredno nakon tretmana, pri čemu je nakon 6 h zabeleženo smanjenje od čak 95,6%. Ovakav obrazac promena ukazuje na to da floretin može značajno uticati na metabolizam prekursora auksina, naročito na one uključene u putanje povezane sa nitrilnim intermedijerima, čime potencijalno doprinosi narušavanju homeostaze auksina u korenskom tkivu. IAN predstavlja značajan prekursor auksina specifičan za familiju Brassicaceae, međutim, njegova uloga prevazilazi samu biosintezu auksina, budući da nitrilaze imaju dominantnu funkciju u metabolizmu glukozinolata, detoksikaciji cijanida i održavanju homeostaze kamaleksina (Vorwerk i sar., 2001; Su i sar., 2011). Kako je kamaleksin ključni fitoaleksin koji se akumulira tokom infekcija patogenima (Tsuji i sar., 1992; Thomma i sar., 1999; Glawischnig, 2007), ali i usled abiotičkog stresa (Zhao i sar., 1998; Bouizgarne i sar., 2006; Kishimoto i sar., 2006), verovatno je da izraženo smanjenje sadržaja IAN u korenu *A. thaliana* tokom tretmana floretinom odražava njegov pojačan utrošak, ne samo u procesu biosinteze IAA, već i u okviru metaboličkih puteva uključenih u sintezu kamaleksina.

Održavanje homeostaze auksina od presudnog je značaja za biljni organizam i regulisano je procesima skladištenja, reaktivacije i nepovratne deaktivacije auksina. Savremeni modeli metabolizma auksina ukazuju na to da su ovi procesi integrisani u jedinstvenu metaboličku mrežu regulisanu enzimskim putem GH3–ILR1–DAO (Hayashi i sar., 2021). Geni familije *GH3* kodiraju acil-aminotransferaze koje katalizuju proces konjugacije IAA sa amino-kiselinama, formirajući konjugate IAA sa aspartatom (IAA-Asp), odnosno glutamatom (IAA-Glu) (Staswick i sar., 2005). Enzim ILR1 (eng. *IAA-Leu-resistant*) aktivira Leu-amidohidrolazu koja oslobađa slobodnu IAA iz konjugata (Le Clere i sar., 2002), dok gen *DAO1* kodira dioksigenazu odgovornu za oksidaciju IAA u oksindol-3-sirćetnu kiselinu (OxIAA) (Porco i sar., 2016; Zhang i sar., 2016). OxIAA predstavlja primarni katabolit IAA u korenu *A. thaliana* (Zhao, 2018). Iako u normalnim uslovima ima ograničenu biološku aktivnost, njegova sinteza se naglo i nepovratno pojačava kao odgovor na povećane koncentracije auksina (Pěncík i sar., 2013). U vrhovima korena postoje specijalizovane ćelije koje regulišu sadržaj OxIAA, čime modulišu auksinski gradijent (Pěncík i sar., 2013; Zhao, 2018).

Unutar regulatornog kompleksa GH3–ILR1–DAO, aminokiselinski konjugati auksina (IAA-Asp i IAA-Glu) funkcionišu kao ključni intermedijeri; oni mogu služiti kao reverzibilni rezervoari IAA ili kao supstrati za ireverzibilnu degradaciju posredovanu DAO enzimima (Hayashi i sar., 2021). Proces katabolizma vodi ka formiranju OxIAA-Asp i OxIAA-Glu, koji se daljom hidrolizom transformišu u OxIAA. Ravnoteža između recikliranja i trajne deaktivacije auksina pomera se ka kataboličkom putu u uslovima endogene prekomerne produkcije ili egzogene primene IAA i njegovih analoga. Rezultati ove disertacije potvrđuju ovaj mehanizam, budući da je sadržaj OxIAA u korenu *A. thaliana* značajno povećan (224,7%) i blisko korelisan sa porastom koncentracije IAA. Izrazita akumulacija OxIAA jasno ukazuje na aktivaciju kataboličkih procesa kao primarnog mehanizma za eliminaciju viška auksina, u cilju uspostavljanja narušene hormonske homeostaze u korenu *A. thaliana*.

Uprkos jasnom porastu OxIAA, sadržaj aminokiselinskih konjugata auksina (IAA-Asp i IAA-Glu) u korenu ostao je stabilan ili je pokazao blagi opadajući trend. Ovakvo zapažanje može biti objašnjeno višim afinitetom DAO1 prema konjugovanim oblicima auksina u odnosu na slobodnu IAA; naime, oksidativna aktivnost ovog enzima prema IAA-Glu je čak 6×10^5 puta veća u poređenju sa slobodnom IAA, u *in vitro* uslovima (Hayashi i sar., 2021). Verovatno je da je prekomerna akumulacija IAA indukovana floretinom inicirala ubrzanu sintezu OxIAA putem brze konverzije IAA-Asp i IAA-Glu konjugata u njihove oksidovane forme (OxIAA-Asp i OxIAA-Glu). Niži afinitet enzima DAO1, definisan višom Mihaelis-Mentenovom konstantom (K_m) prema IAA-Asp u odnosu na IAA-Glu (Hayashi i sar., 2021), dodatno razjašnjava zašto je sadržaj IAA-Glu bio značajnije redukovan u odnosu na IAA-Asp. Slični mehanizmi homeostaze opisani su i za sintetičke auksine. Eyer i saradnici (2016) su identifikovali aminokiselinski konjugat 2,4-D (2,4-D-Glu) u znatno nižim koncentracijama u poređenju sa slobodnim oblikom, što potvrđuje njihovu ulogu kao reverzibilnih rezervoara koji učestvuju u finoj regulaciji sadržaja auksina.

U celini posmatrano, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na to da floretin ispoljava izraženo fitotoksično delovanje koje je povezano sa izraženom akumulacijom auksina u korenu i poremećajem sadržaja njegovih prekursora i katabolita. Verovatno je da ovako narušavanje auksinske homeostaze pokreće kompleksan niz fizioloških i morfogenetičkih promena, koje se manifestuju inhibicijom rastanja i razvika korenovog sistema, pojavom razvojnih deformacija i gubitkom pravilnog gravitropskog odgovora.

5.6.2. Uticaj floretina na distribuciju auksina u vrhovima korena

Distribucija auksina u biljnim tkivima predstavlja dinamičan proces koji je usko povezan sa razvojnim stadijumom biljke i modulisan delovanjem činilaca spoljašnje sredine uključujući faktore biotičkog i abiotičkog stresa (Tanaka i sar., 2006; Vanneste i Friml, 2009; Brunoud i sar., 2012; Zhao, 2018). U skladu sa zapaženim delovanjem floretina, kao stresogenog faktora koji je izazvao intenzivan porast sadržaja auksina u korenu juvenilnih biljaka *A. thaliana*, precizna procena prostorne distribucije fiziološki aktivnog auksina, odnosno indirektna lokalizacija njegove fiziološke aktivnosti od presudnog je značaja za bliže sagledavanje fiziološkog odgovora vrhova korena na floretin i objašnjenje njegovog uticaja na razvoj opisanih morfoloških promena. Sa tim ciljem, vizuelizovano je i kvantifikovano prisustvo zelenog fluorescentnog signala kao indirektnog pokazatelja auksinske aktivnosti u biljnim tkivima. Ovo je postignuto korišćenjem DR5rev::GFP transgene linije *A.*

thaliana koja sadrži sintetički promotorski element sastavljen od više ponovljenih elemenata osetljivih na auksin (eng. *auxin response elements*; ARE), a koji aktivira transkripciju gena za zeleni fluorescentni protein (eng. *green fluorescent protein*; GFP) u prisustvu povišenih nivoa auksina (Pařízková i sar., 2017). Na ovaj način, DR5rev::GFP transgena linija omogućava preciznu vizuelizaciju prostorne i temporalne distribucije auksina u biljnim tkivima i kvantitativno praćenje modifikacija auksinske signalizacije tokom razvoja biljke ili kao odgovor na egzogene tretmane.

Rezultati analize su pokazali značajne promene u distribuciji auksina u korenu tretiranih biljaka *A. thaliana*, sa intenzivnom akumulacijom u bočnim delovima vrha korena, posebno u bočnim stranama korenove kape, epidermisu i ćelijama korteksa, koje predstavljaju glavne puteve bazipetalnog protoka auksina u korenu. Dobijeni rezultati se mogu interpretirati u svetlu podataka dobijenih analizom ekspresije ključnih gena uključenih u polarni transport auksina (Stanišić, 2019). Rezultati analize genske ekspresije pokazali su pojačanu ekspresiju gena za transport auksina *PIN1*, *PIN3*, *PIN7* i *ABCB1* kod *A. thaliana* izloženih floretinu nakon 2, 6, 12 i 24 h tretmana (Stanišić, 2019). Poznato je da se auksinski transporter PIN1 dominantno eksprimira u steli korena (Gälweiler i sar., 1998) i učestvuje u akropetalnom transportu auksina, zajedno sa PIN3 i PIN7 proteinima. Oba pomenuta transportera su lokalizovana u ćelijama pericikla i kolumele i usmeravaju tok auksina ka vrhu i bočnim stranama korena (Friml i sar., 2002; Billou i sar., 2005). Verovatno je da pojačana ekspresija *PIN1*, *PIN3* i *PIN7* gena indukovana floretinom deluje sinergistički sa lokalnom biosintezom auksina, formirajući izražen auksinski maksimum u vrhovima korena i povećanu akumulaciju auksina u bočnim delovima korena, kao što je pokazano u korenovima DR5rev::GFP transgene linije *A. thaliana*. Slični mehanizmi su opisani i kod fitotoksičnog delovanja drugih alelohemikalija, posebno bisfenola A (Bahmani i sar., 2020) i diterpenoida veisiensina B (eng. *Weisiensin B*) (Li i sar., 2019), gde je takođe zabeležena povećana ekspresija gena *PIN1*, *PIN3* i *PIN7* u korenu. Araniti i saradnici (2017) su upotrebom reportera pDR5::GFP, ukazali na narušenu distribuciju auksina u korenu sedmodnevnih juvenilnih biljaka *A. thaliana* tretiranih seskviterpenom farnezenom, gde je distribucija auksina bila maksimalna u mirujućem centru i početnim ćelijama kolumele, bez proširenja na zrele ćelije kolumele, uz ekstremnu promenu distribucije transportnih proteina PIN3, PIN4 i PIN7 (Araniti i sar., 2017).

Homeostaza auksina igra ključnu ulogu u koordinaciji gravitropskog odgovora korena. Zapravo, pravilna percepcija gravitacije zavisi od simetrične distribucije PIN3 proteina koja omogućava uniformno kretanje auksina ka bočnim stranama vrha korena, odakle se auksin uključuje u bazipetalni transportni tok posredovan PIN2 proteinom (Friml i sar., 2002; Kleine-Vehn i sar., 2010). Svako narušavanje ekspresije ili dinamike PIN2 i PIN3 proteina, odnosno pravilne distribucije auksina delovanjem stresnih činilaca, dovodi do poremećaja gravitropskog odgovora (Shibasaki i sar., 2009; Hanzawa i sar., 2013; Yan i sar., 2015). Sveukupno posmatrano, rezultati ove disertacije ukazuju na to da je agravitropski fenotip kod klijanaca *A. thaliana* tretiranih floretinom najverovatnije posledica sinergističkog efekta izmenjene distribucije auksina u vrhovima korena i smanjenog sadržaja skrobnih zrna u ćelijama kolumele.

Aktivnost proteina iz superfamilije transportera ATP-vezujućih kaseti (eng. *ATP-BINDING CASSETTE*), posebno ABCB1, ABCB4 i ABCB19, doprinosi usmerenom kretanju auksina u biljkama (Geisler i sar., 2005; Terasaka i sar., 2005; Lewis i sar., 2007). Protein ABCB19 je lokalizovan u vaskularnim tkivima hipokotila i korena, doprinoseći akropetalnom transportu auksina, dok su ABCB1 i ABCB4 proteini uključeni u preusmeravanje njegovog toka od vrha korena ka izdanku. Shodno tome, mutanti kojima nedostaje ABCB1 protein odlikuju se smanjenim

bazipetalnim transportom (Geisler i sar., 2005). Ovi nalazi ukazuju na važnost ABCB proteina u posredovanju transporta produkata katabolizma IAA u regionima izloženim visokim koncentracijama auksina (Geisler i sar., 2005), kao i u gravitropskom odgovoru biljaka. S obzirom na to da ABCB transporteri stabilno zadržavaju svoju lokalizaciju u ćelijskim membranama pri delovanju unutrašnjih ili spoljašnjih činilaca (Cho i sar., 2012), promena u njihovim nivoima ekspresije, kao što je značajno povećanje ekspresije *ABCB1* gena u korenu juvenilnih biljaka *A. thaliana* tretiranih floretinom (Stanišić, 2019), mogla bi doprineti modulaciji bazipetalnog transporta auksina podržanoj PIN proteinima, odnosno njegovoj akumulaciji u bočnim delovima vrha korena.

Sveukupno posmatrano, dobijeni rezultati ukazuju na to da floretin može selektivno uticati na pojedine tipove auksinskih transportera u korenu, čime narušava auksinsku homeostazu i prostornu distribuciju ovog fitohormona. Posledica takvih promena je stagnacija rastenja, poremećaj gravitropskog odgovora i pojava razvojnih deformacija, uz moguće promene i u drugim aspektima fiziologije i metabolizma juvenilnih biljaka *A. thaliana*.

5.7. UTICAJ FLORETINA NA ANTIOKSIDATIVNI STATUS JUVENILNIH BILJAKA

Jedna od najznačajnijih posledica izloženosti biljaka stresu je generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), uključujući singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$), superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksil-radikal ($\bullet\text{OH}$) i vodonik-peroksid (H_2O_2). Zbog svoje visoke reaktivnosti, ovi molekuli stupaju u interakciju sa ključnim ćelijskim komponentama poput DNK, proteina, lipida i pigmenata, inicirajući niz destruktivnih procesa (Lamb i Dixon, 1997; Ashraf, 2009). Kao odgovor na akumulaciju ROS, biljke aktiviraju enzimski i neenzimski antioksidativni sistem zaštite. Važno je istaći da se sadržaj antioksidanata, kao i intenzitet metaboličke aktivnosti, razlikuju u zavisnosti od tipa tkiva i organa (Ashraf, 2009). Kada produkcija ROS nadmaši kapacitet antioksidativne zaštite, nastupa stanje oksidativnog stresa koje može da vodi ka toksičnim oštećenjima ćelije.

Iako je poznato da akumulacija ROS utiče na redistribuciju auksina i posredno na morfološke promene kod juvenilnih biljaka *A. thaliana* izloženih stresu (Pasternak i sar., 2023), rezultati ove disertacije ukazuju na to da kratkotrajni tretman floretinom (5 i 10 dana) nije izazvao oksidativni stres kod tretiranih biljaka, već je naprotiv, povećao antioksidativni kapacitet ćelija kroz povišene vrednosti ukupnog antioksidativnog kapaciteta (eng. *total antioxidant capacity*, TAC) i sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (eng. *total phenolic content*, TPC), smanjujući istovremeno sadržaj malondialdehida (MDA) i aktivnost antioksidativnih enzima katalaza (CAT), peroksidaza (POD) i superoksid-dismutaza (SOD) (Poglavlje 4.7.2). Visoka TAC vrednost kod juvenilnih biljaka *A. thaliana* tretiranih floretinom korelirala je sa povećanim sadržajem TPC, što se može pripisati apsorbovanom floretinu iz hranljive podloge (Poglavlje 4.10). Ovi rezultati su u skladu sa antioksidativnim potencijalom fenolnih jedinjenja koji je detaljno dokumentovan, sa posebnim naglaskom na prednostima dihidrohalkona u odnosu na flavonoide kao što su naringenin i hesperidin (Nakamura i sar., 2003). Za ovakvo antioksidativno delovanje dihidrohalkona je esencijalna hidroksilna grupa na poziciji 2' (A prsten), formirana redukcijom C prstena (Nakamura i sar., 2003).

Studije potvrđuju da supstitucija ove grupe glukozom umanjuje antioksidativnu efikasnost floretina, što je potvrđeno u slučaju njegovih glikozilovanih derivata florizina i trilobatina (Behzad i sar., 2017; Li i sar., 2018).

Vodonik-peroksid (H_2O_2) je neradikalni produkt redukcije kiseonika, rastvorljiv u vodi i karakterističan po dužem poluvremenu raspada, što mu omogućava ulogu ključnog signalnog molekula u procesima razvoja i percepcije stresa (Corpas, 2015; Del Río, 2015). Iako uslovi stresa po pravilu indukuju prekomernu produkciju H_2O_2 i posledična ćelijska oštećenja, rezultati ove disertacije ne beleže porast sadržaja ovog jedinjenja na vrsti *A. thaliana* tretiranoj floretinom. Odsustvo akumulacije H_2O_2 direktno potvrđuje da floretin, u ispitivanim koncentracijama, ne izaziva klasičan oksidativni stres. Dok većina alelohemikalija ispoljava fitotoksičnost upravo kroz naglo povećanje nivoa ROS (Batish i sar., 2006; Graña i sar., 2013; Araniti i sar., 2020), stabilnost sadržaja vodonik-peroksida u tretiranim biljkama ukazuje na to da floretin poseduje specifičan mehanizam delovanja koji se suštinski razlikuje od većine poznatih alelopatskih agenasa.

Sadržaj malondialdehida (MDA), kao ključnog indikatora lipidne peroksidacije, bio je značajno niži kod juvenilnih biljaka tretiranih floretinom u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultati su pokazali redukciju sadržaja MDA za 32% nakon 5 dana, odnosno za 51% nakon 10 dana tretmana, što ukazuje na smanjen intenzitet oksidativnog oštećenja membrana. Ovakav efekat se pripisuje antioksidativnoj prirodi floretina, koja je već dokumentovana u literaturi (Rezk i sar., 2002; Nakamura i sar., 2003; Bentes i sar., 2011; Behzad i sar., 2017; Li i sar., 2018). Smanjenje nivoa MDA ispod kontrolnih vrednosti sugerise protektivnu ulogu tretmana, s obzirom da čak i minimalna redukcija lipidne peroksidacije doprinosi očuvanju integriteta ćelijskih membrana. Slični trendovi zabeleženi su i kod egzogene primene prolina kod vinove loze (*Vitis vinifera* L.) (Ozden i sar., 2009) i silicijuma kod ruže (*Rosa x hybrida* L.) (Reezi i sar., 2009). Suprotno ovim nalazima, u najvećem broju studija alelohemikalije su dovodile do lipidne peroksidacije membrana i porasta sadržaja MDA (Batish i sar., 2006; Singh i sar., 2009; Sánchez-Moreiras i sar., 2011; Soltys i sar., 2011, 2012; Chowhan i sar., 2014; Soltys i sar., 2014; Zhu i sar., 2014; Yan i sar., 2016; Araniti i sar., 2017; Ren i sar., 2017; Zhu i sar., 2017; Araniti i sar., 2020; Landi i sar., 2020; Zhang i sar., 2020a; Staszek i sar., 2021), što je bila indikacija oksidativnog stresa.

Prolin ostvaruje višestruku zaštitnu ulogu kao osmoprotektant i antioksidans, doprinoseći stabilizaciji ćelijskih struktura i neutralizaciji slobodnih radikala. Njegova akumulacija predstavlja tipičan odgovor na abiotički stres, usmeren ka zaštiti tkiva od oksidativnih oštećenja (Szabados i Saviouré, 2010; Matysik i sar., 2022). Biosinteza prolina primarno je lokalizovana u metabolički aktivnim meristemskim zonama, poput apeksa korena i izdanka (Funck i sar., 2010), dok njegov metabolizam, uz simultanu stimulaciju oksidativnog pentozofosfatnog puta, učestvuje u održavanju redoks ravnoteže ($NADP^+/NADPH$) (Hare i sar., 2003). U tom kontekstu, stabilan sadržaj prolina kod klijanaca tretiranih floretinom u ovoj studiji predstavlja dodatni dokaz o odsustvu oksidativnog stresa. Ovakav rezultat je u suprotnosti sa efektima drugih alelohemikalija, kao što su umbeliferon (Yan i sar., 2016), β -cembrenediol (Ren i sar., 2017) ili izolikviritigenin, jedinjenje strukturno slično floretinu (Zhang i sar., 2020b), koji indukuju značajno povećanje sadržaja prolina kao odgovor na stres.

Istraživanja u oblasti alelopatije ukazuju na to da aktivnost antioksidativnih enzima SOD, CAT i POD varira u zavisnosti od vrste i koncentracije primenjenih alelohemikalija (Gniazdowska i sar., 2015; Anjum i sar., 2016). U mnogim studijama primećeno je povećanje njihove aktivnosti kao

zaštitni odgovor biljaka na uslove stresa (Guo i Li, 2000; Motamedi i sar., 2023; Wang i sar., 2023a). S druge strane, različiti činioci stresa, uključujući delovanje alelohemikalija, mogu inhibirati aktivnost većeg broja antioksidativnih enzima (Aki i sar., 2009; Cheng i Cheng, 2015). Tako je, na primer, ruzmarinska kiselina, prirodno prisutna u vrstama iz porodica Boraginaceae i Lamiaceae, direktno inhibirala aktivnost SOD i CAT u juvenilnim biljkama *A. thaliana* (14-dnevni korenovi) za 29%, odnosno 64%, (Araniti i sar., 2018). Slično tome, tretman juvenilnih biljaka pirinča (*Oryza sativa* L.) vodenim ekstraktom kineskog pelena (*Artemisia argii* H. Lév. & Vaniot) uticao je na smanjenje aktivnosti CAT i POD, dok je povećao aktivnost SOD na dozno-zavisani način (Li i sar., 2022).

Zapažanje da kratkotrajni tretman floretinom nije doveo do povećanja parametara oksidativnog stresa, kao što su vodonik-peroksid, MDA i prolin, uz značajno sniženje aktivnosti antioksidativnih enzima, navodi na zaključak o mogućem postojanju inhibicije ovih enzima usled direktne interakcije sa molekulom floretina. Iz tog razloga, sproveden je integrativni analitički pristup koji je obuhvatio *in vitro* kinetičku analizu sa ciljem određivanja tipa i mehanizma inhibicije, kao i *in silico* analizu enzimske inhibicije zasnovanu na molekularnom dokingu i simulacijama molekulske dinamike, koje su diskutovane u narednom poglavlju.

5.8. ANALIZA INHIBICIJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE I PEROKSIDAZE FLORETINOM

Kinetička ispitivanja, kao i nativna PAGE analiza praćena vizuelizacijom enzimske aktivnosti, potvrdile su neposredno inhibitorno delovanje floretina na odabrane komercijalno dostupne i visoko prečišćene antioksidativne enzime, katalazu iz goveđe jetre i peroksidazu rena. Dobijeni rezultati ukazuju da floretin ispoljava značajan inhibitorni efekat na aktivnost obe ispitivane oksidoreduktaze, pri čemu se mehanizam inhibicije razlikuje u zavisnosti od enzimskog sistema. Spektrofotometrijska analiza i određivanje preostale enzimske aktivnosti (eng. *residual enzyme activity*, REA), omogućili su kvantifikaciju ovog efekta, a procenjene IC₅₀ vrednosti (322,2 μM za katalazu i 342,8 μM za peroksidazu rena) ukazuju na umeren inhibitorni potencijal floretina.

U slučaju katalaze, kinetička analiza zasnovana na nelinearnom fitovanju Michaelis–Mentenovog modela i Lineweaver–Burk dijagramu pokazala je istovremeno smanjenje vrednosti maksimalne brzine enzimske reakcije (V_{max}) i Michaelis–Mentenove konstante (K_m), što ukazuje na mešoviti tip inhibicije sa dominantnom nekompetitivnom komponentom. Ovakav obrazac sugerise da floretin interaguje i sa slobodnim enzimom i sa enzim–supstrat kompleksom, ali sa različitim afinitetom. Visoka vrednost konstante inhibicije za slobodan enzim (K_i) i znatno niža konstanta inhibicije za enzim–supstrat kompleks (K_i'), zajedno sa niskim faktorom α , ukazuju na preferencijalno vezivanje inhibitora za enzim–supstrat kompleks, koji se time stabilizuje u neaktivnom obliku. Ovakav odnos kinetičkih parametara objašnjava dozno-zavisno smanjenje brzine reakcije u prisustvu floretina, naročito pri višim koncentracijama supstrata, gde je formiranje kompleksa enzim–supstrat izraženije. Blaga odstupanja sekundarnih plotova od linearne zavisnosti ukazuju na parcijalni karakter

inhibicije, odnosno na činjenicu da enzim zadržava deo aktivnosti i pri višim koncentracijama inhibitora.

Nasuprot tome, kod peroksidaze rena uočen je porast K_m uz praktično nepromenjen V_{max} , što predstavlja karakterističan kinetički obrazac kompetitivne inhibicije. Lineweaver–Burk analiza dodatno potvrđuje ovaj mehanizam, budući da se regresione prave seku u istoj tački na Y-osi, uz povećanje nagiba sa porastom koncentracije inhibitora. Dobijena vrednost K_i ukazuje na umeren afinitet floretina prema slobodnom enzimu, dok izrazito visoka vrednost α i posledično velika K_i' potvrđuju da je interakcija inhibitora sa enzim–supstrat kompleksom zanemarljiva. Stoga floretin deluje kao čisti kompetitivni inhibitor, vezujući se za aktivno mesto enzima i sprečavajući vezivanje supstrata. U skladu sa tim, inhibitorski efekat je izraženiji pri nižim koncentracijama gvajakola, dok se pri višim koncentracijama supstrata delimično prevazilazi. Rezultati nativne PAGE analize dodatno potvrđuju dozno-zavisno smanjenje aktivnosti katalaze i peroksidaze rena u prisustvu floretina.

Sveukupno, rezultati ukazuju da floretin deluje kao umeren inhibitor sa enzim-specifičnim mehanizmima delovanja: parcijalni mešoviti inhibitor katalaze sa dominantnom interakcijom sa enzim–supstrat kompleksom, i kompetitivni inhibitor peroksidaze rena koji se vezuje za slobodan enzim. Ove razlike ukazuju na specifičnost interakcija floretina sa različitim enzimskim sistemima i sugerišu njegov potencijalni značaj u regulaciji oksidativnih procesa u biološkim sistemima.

Inhibitorsko delovanje floretina na različite enzimске sisteme koji nisu uključeni u antioksidativnu zaštitu zabeleženo je u novijoj literaturi. Nedavna istraživanja su pokazala da floretin direktno inhibira enzim α -glukozidazu izolovanu iz pivskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), mehanizmom mešovite inhibicije sa IC_{50} vrednostima od 141 μM , odnosno 109 μM (Han i sar., 2017; Ren i sar., 2024). Konstanta inhibicije za slobodan enzim (K_i) procenjena je na 36,7 μM , što je znatno niže u odnosu na vrednost ove konstante za katalazu ($K_i = 42\,949\, \mu M$). Ovaj podatak ukazuje na mnogo veći afinitet floretina prema slobodnoj α -glukozidazi, nego prema slobodnoj katalazi. U slučaju katalaze, floretin ispoljava znatno veći afinitet prema kompleksu enzim–supstrat ($K_i' = 63,5\, \mu M$). Ovi rezultati ukazuju na to da, uprkos istom mehanizmu inhibicije mešovitog tipa, postoje razlike u preferenciji inhibitora prema enzimu ili njegovom kompleksu sa supstratom, što utiče na tok enzimске reakcije. Slična vrednost konstante inhibicije K_i od 31,8 μM utvrđena je u slučaju inhibicije ksantin-oksidge floretinom (Wen i sar., 2024).

Slično tome, floretin je reverzibilno inhibirao tirozinazu mešovitim mehanizmom kroz višefazni kinetički proces sa IC_{50} vrednošću od 169,4 μM (Chen i sar., 2020). Vrednost konstante inhibicije za slobodan enzim (K_i) iznosila je 136 μM , dok je za kompleks enzim–supstrat (K_i') bila približno tri puta veća, odnosno 358 μM . Ovi rezultati su ukazali na preferenciju floretina za slobodnu tirozinazu, pre nego za kompleks tirozinaze sa supstratom (L-DOPA), što je potvrđeno i vrednošću parametra α većom od 1 ($\alpha = 2,63$). Nasuprot tome, u slučaju katalaze, iako je prisutan isti tip inhibicije mešovitog karaktera, odnos vrednosti K_i i K_i' , kao i vrednost parametra α znatno manja od 1 ($\alpha = 0,001478$), ukazuju na izraženiji afinitet floretina prema kompleksu enzim–supstrat, nego prema slobodnom enzimu. Na osnovu pomenutih studija, može se uočiti da jedino u slučaju katalaze, floretin izaziva mešovitu inhibiciju sa dominantno nekompetitivnom komponentom, dok je u ostalim slučajevima ona pretežno kompetitivnog tipa. Sveukupno, ovi nalazi potvrđuju visoku selektivnost i specifičnost interakcije floretina sa različitim enzimskim sistemima.

Istraživanja Constantin i saradnika (2025a) pokazala su da floretin inhibira enzim piruvat-ortofosfat-dikinazu iz kukuruza (*Zea mays* L.), koja ima ključnu ulogu u C4 fotosintezi i metaboličkim putevima koji zahtevaju regeneraciju fosfoenolpiruvata. Na osnovu dobijenih vrednosti za K_i (161,9 μM) i K_i' (326,1 μM), utvrđeno je da floretin deluje mehanizmom mešovite inhibicije, gde pokazuje veći afinitet prema slobodnom enzimu nego kompleksu enzim–supstrat, odnosno ima dominantnu kompetitivnu komponentu. Navedene studije (Han i sar., 2017; Chen i sar., 2020; Ren i sar., 2024; Wen i sar., 2024; Constantin i sar., 2025a) dosledno potvrđuju da floretin najčešće deluje kao mešoviti inhibitor, utičući na K_m i V_{max} vrednosti, što je potvrđeno i u slučaju inhibicije katalaze u ovoj doktorskoj disertaciji. Među navedenim nalazima, peroksidaza je jedini enzim koji je floretin inhibirao na kompetitivni način, što ukazuje na drugačija mesta vezivanja floretina kod različitih enzimskih sistema. Načini vezivanja floretina za katalazu i peroksidazu rena i određivanje ključnih interakcija na molekularnom nivou identifikovani su primenom *in silico* analiza enzimske inhibicije putem molekularnog dokinga i simulacija molekulske dinamike. Ovim pristupom potvrđeni su zaključci koji proizilaze iz *in vitro* analize enzimske kinetike, i proverena je stabilnost kompleksa enzim–inhibitor tokom vremena.

Iako floretin dovodi do inhibicije oba proučavana enzima, *in silico* analize ukazuju da se ovi efekti ostvaruju putem različitih mehanizama vezivanja za katalazu i peroksidazu. Kod katalaze, floretin interaguje sa NADP(H) vezujućom regijom, uspostavljajući vodonične veze sa Arg203 i Tyr215 reziduama enzima, koje se nalaze van njegovog katalitičkog centra. Svaka subjedinica katalaze sadrži aminokiselinske ostatke, hem grupu (gvožđe (III) protoporfirin IX) i molekul NADP(H), koji je čvrsto vezan za enzim (Kirkman i Gaetani, 1984, 2007; Ko i sar., 2000; Safo i sar., 2001). Uloga NADP(H) u strukturi katalaze detaljno je istražena. Ovaj kofaktor sprečava formiranje neaktivnog oblika enzima (gvožđe (IV) okso-porfirin IX) i ubrzava njegovu regeneraciju. Na taj način, NADP(H) direktno štiti katalazu od inaktivacije vodonik-peroksidom (Kirkman i sar., 1987, 1999; Hillar i Nichols, 1992; Almarsson i sar., 1993; Olson i Bruice, 1995; Rovira, 2005). Vezivanjem floretina za NADP(H) vezujuću regiju enzima, onemogućava se vezivanje NADP(H) i time narušava njegova stabilizujuća uloga i posredno smanjuje katalitičku aktivnost enzima. Ovakva alosterička inhibicija potvrđuje dominantno nekompetitivni mehanizam inhibicije katalaze pretpostavljen na osnovu dobijenih podataka eksperimentalne kinetičke analize. Takođe, na osnovu utvrđenog mehanizma inhibicije katalaze iz goveđe jetre, može se pretpostaviti da floretin deluje na sličan način i na katalaze u tkivima juvenilnih biljaka *A. thaliana*, čime bi se moglo objasniti značajno smanjenje njihove aktivnosti kod biljaka na tretmanu floretinom.

U slučaju peroksidaze rena, *in silico* analiza je pokazala da floretin uspostavlja vodonične veze prvenstveno sa aminokiselinskim ostacima iz katalitičkog regiona enzima, posebno sa Arg38 i Ala140. U katalitičkom centru peroksidaze nalazi se prostetička grupa (hem) koja je stabilizovana aminokiselinskim ostacima, kao i sa dva jona Ca^{2+} , smeštenim proksimalno i distalno u odnosu na ravan hem grupe, pri čemu ponekad može biti prisutan i jon K^+ (Almargo i sar., 2009; Singh i sar., 2012). Direktno vezivanje floretina za katalitičko mesto sprečava pristup supstrata i inhibira katalitičku funkciju enzima. Ovakav način interakcije floretina sa peroksidazom ukazuje na potpuni kompetitivni tip inhibicije. Rezultati *in silico* molekularnog dokinga i simulacija molekulske dinamike korespondiraju sa eksperimentalnim kinetičkim studijama, potvrđujući ovaj način inhibicije. Ove rezultate potvrđuju i novija istraživanja Faerman i saradnika (2025), koji su eksperimentalno potvrdili da floretin i kvercetin snažno inhibiraju aktivnost peroksidaze rena. Istraživanja ovih autora su pokazala da floretin ometa specifičan Amplex UltraRed (AUR)

fluorescentni test koji se zasniva na upotrebi peroksidaze rena. Dok je u niskim koncentracijama (50 i 100 μM) onemogućio detekciju vodonik-peroksida u izolovanim mitohondrijama jetre i potpuno eliminisao signal AUR testa, floretin nije pokazao interferenciju sa testovima zasnovanim na dihlorodihidrofluorescein diacetatu ($\text{H}_2\text{-DCFDA}$) i dihidroetidijumu (DHE). Ovo je potvrdilo selektivnost floretina prema peroksidazi rena. Autori su takođe pokazali da je kvercetin snažniji inhibitor peroksidaze u poređenju sa floretinom. Inhibicija peroksidaze rena floretinom, iako potvrđena od strane Faerman i saradnika (2025), u ovoj doktorskoj disertaciji je, primenom integrativnog pristupa, po prvi put sveobuhvatno okarakterisana, kroz kombinaciju eksperimentalnih i *in silico* pristupa, sa posebnim osvrtom na molekularne interakcije i kinetički tip inhibicije.

Sveobuhvatno gledano, dok floretin ispoljava mešoviti tip inhibicije prema većini testiranih enzima, uključujući α -glukozidazu, piruvat-ortofosfat-dikinazu i katalazu, čisto kompetitivna inhibicija peroksidaze ukazuje na jedinstven modalitet interakcije. Ovo sugerise da fenolna struktura floretina poseduje visoku komplementarnost sa aktivnim centrom peroksidaze, ali ne i sa njenim alosteričkim domenima, za razliku od ostalih proučavanih enzima. S obzirom na to da energija vezivanja odražava količinu energije oslobođene ili apsorbovane pri interakciji proteina i liganda (Thakur i Pande, 2021), utvrđena niža (negativnija) vrednost energije vezivanja floretina u slučaju peroksidaze rena ($-8,307 \text{ kcal mol}^{-1}$) u odnosu na katalazu ($-7,708 \text{ kcal mol}^{-1}$), potvrđuje nešto jače i stabilnije vezivanje ovog dihidrohalkona za katalitički centar peroksidaze nego za NADP(H) regiju katalaze. Međutim, oba kompleksa (floretin – peroksidaza i floretin – katalaza) pokazuju značajnu termodinamičku stabilnost u fiziološkim uslovima, što je potvrđeno analizom ukupne potencijalne energije. U oba sistema dominiraju elektrostatičke interakcije (oko 70% ukupne energije), dok van der Waalove interakcije doprinose sa približno 20%. Ovakav energetski profil potvrđuje da su identifikovane konformacije stabilne i da floretin ostvaruje snažne, dugotrajne kontakte sa oba enzima. Dodatno, RMSD analizom je potvrđena strukturna stabilnost oba kompleksa floretin-enzim, uz nešto rigidniju konformaciju u slučaju peroksidaze u poređenju sa katalazom. Veća mobilnost floretina u NADP(H) regiji katalaze je u skladu sa utvrđenim alosteričkim tipom inhibicije. Nasuprot tome, niže vrednosti RMSD kod peroksidaze ukazuju na čvršće vezivanje floretina u katalitičkom centru, što je u skladu sa utvrđenim kompetitivnim mehanizmom inhibicije. Specifičnost ovih interakcija određuju ključni aminokiselinski ostaci, pri čemu Arg38 i Ala140 kod peroksidaze formiraju stabilne kontakte sa floretinom. Značaj ostatka Arg38 u stabilizaciji liganada na ivici prostetičke hem grupe istaknut je i kod interakcija u kompleksu IAA–peroksidaza rena (Zarei i sar., 2022). Mreža identifikovanih interakcija stabilizuje komplekse bez konformacionog naprezanja liganada, čime se potvrđuje visoka efikasnost floretina kao inhibitora aktivnosti oba enzima.

Analizom srednjeg kvadratnog kolebanja identifikovane su ključne promene u lokalnoj dinamici enzima nakon vezivanja floretina, pružajući strukturno objašnjenje za različite kinetičke mehanizme inhibicije. Kod katalaze, ostaci NADP(H) regije su pokazali heterogene obrasce fleksibilnosti, što potvrđuje alosterični efekat floretina karakterističan za mešovitu inhibiciju. Nasuprot tome, kod peroksidaze je zabeležena značajna stabilizacija katalitičkog centra, gde su ranije pomenuti ključni aminokiselinski ostaci Arg38 i Ala140 pokazali drastično smanjenu fleksibilnost. Ovakvo smanjenje RMSF vrednosti direktno ukazuje na stabilizaciju mesta vezivanja i potvrđuje snažan afinitet floretina prema aktivnom centru peroksidaze, što je u potpunom skladu sa utvrđenim kompetitivnim mehanizmom.

Praćenje radijusa giracije potvrdilo je očuvanje ukupne kompaktnosti oba enzima tokom interakcije sa floretinom. Kod katalaze, vrednosti Rg su se stabilizovale nakon 50 ns, dok je

peroksidaza postigla izrazitu strukturnu stabilnost nakon 70 ns sa minimalnim fluktuacijama od oko 1 Å. Odsustvo trendova širenja ili sažimanja proteina ukazuje na to da vezivanje floretina ne izaziva drastične konformacione promene u globalnoj topologiji enzima. Ovakav strukturni integritet, uz niske RMSD vrednosti, potvrđuje da se inhibitorni efekat ostvaruje kroz specifične lokalne interakcije u aktivnim i alosteričnim mestima, a ne kroz denaturaciju ili narušavanje tercijarne strukture proteina. Za razliku od floretina, kvercetin je pored inhibicije aktivnosti katalaze, doveo i do značajnih konformacionih promena (Rashtbari i sar., 2017). Slični efekti primećeni su i pri ispitivanju delovanja aspirina na katalazu, pri čemu nisu značajno uticali na aktivnost enzima (Koohshekan i sar., 2016). Termodinamičkom analizom utvrđeno je da van der Waalsove sile i vodonične veze igraju glavnu ulogu u interakciji aspirina i katalaze, što pokazuje da se ovaj mehanizam značajno razlikuje od načina na koji deluje floretin. Naime, analizom ostvarenih veza između enzima i floretina pokazano je da u kompleksima katalaza–floretin i peroksidaza–floretin dominiraju hidrofobni kontakti. Celokupna interakcijska mapa ukazuje na više stabilnih mesta vezivanja floretina u strukturi katalaze, pri čemu se vezivanje oslanja dominantno na hidrofobne efekte uz minimalan doprinos vodoničnih i jonskih veza. Za razliku od katalaze, u kompleksu peroksidaza–floretin pronađene su, pored hidrofobnih kontakata, i vodonične veze, koje su u značajnoj meri bile prisutne i konzistentne, što ukazuje na stabilno i dugotrajno vezivanje liganda za katalitičko mesto enzima. Hidrofobni kontakti su takođe dominirali u slučajevima vezivanja kvercetina za katalazu (Rashtbari i sar., 2017) i spirobrasinina, alelohemikalije karakteristične za familiju Brassicaceae, za peroksidazu (Wang i sar., 2023b), dok su kod elaginske kiseline, koja stimuliše aktivnost katalaze, podjednako dominirali hidrofobni kontakti i vodonične veze (Rashtbari i sar., 2020).

Razlike u mestima i načinu vezivanja objašnjavaju različite mehanizme inhibicije zapažene u kinetičkim studijama i pružaju molekularnu osnovu za razumevanje kako floretin selektivno moduliše aktivnost katalaze i peroksidaze. Sveukupno, nalazi u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da je smanjenje aktivnosti katalaze i peroksidaze u tkivima juvenilnih biljaka *A. thaliana* moguća posledica direktnog inhibitornog delovanja floretina na ove enzime.

5.9. ANALIZA STABILNOSTI FLORETINA U HRANLJIVIM PODLOGAMA

Trenutno postoji nedostatak relevantnih podataka o stabilnosti dihidrohalkona, kako u zemljištu, tako i u uslovima *in vitro*, što značajno ograničava razumevanje njihovog ponašanja i stabilnosti. Može se pretpostaviti da je polужivot floretina u zemljištu uslovljen prisustvom različitih faktora, uključujući mikrobnu aktivnost, pH vrednost zemljišta, njegov sastav, klimatske uslove i druge faktore sredine. Više studija analiziralo je hemijski sastav i koncentracije floretina i florizina u zemljištu zasada jabuke pogođenih bolešću presađivanja jabuke (ARD), kao i promene uslovljene faktorima sredine i pozicioniranjem (Jinshui i sar., 2008; Hofmann i sar., 2009; Yin i sar., 2016). Jiang i sar. (2023) su pokazali da soj W6 bakterije *Ochrobactrum haematophilum*, uobičajen u zemljištu i rizosferi biljaka, poseduje sposobnost degradacije dihidrohalkona u zemljištu.

Međutim, može se pretpostaviti da je stabilnost floretina u odsustvu zemljišnih mikroorganizama, tj. u aseptičnim *in vitro* uslovima znatno bolja. Zhang i sar. (2018a) su pokazali da je floretin stabilan u kiselom okruženju i pri povišenim temperaturama, dok je podlozan degradaciji u alkalnim i snažno oksidujućim uslovima. Rezultati spektrofotometrijske analize tečnih hranljivih podloga koje su sadržale floretin u ovoj disertaciji pokazali su da sadržaj floretina ostaje gotovo nepromenjen tokom deset dana tretmana, što potvrđuje da ne dolazi do spontane degradacije usled fizičko-hemijskih interakcija sa komponentama medijuma ili faktorima sredine. Međutim, potrebno je napomenuti da određeni degradacioni produkti floretina zadržavaju sposobnost apsorpcije na talasnoj dužini od približno 285 nm, usled delimično očuvane difenilpropanoidne strukture, što ukazuje na ograničene mogućnosti spektrofotometrijske analize da razlikuje prisustvo floretinskog aglikona od njegovih derivata. Ipak, iako je spontana oksidacija ili degradacija floretina u vodenim rastvorima moguća, stabilni uslovi kiselosti (pH 5,5) i temperature, zajedno sa odsustvom mikrobnih enzima u sterilnom hranljivom medijumu, značajno smanjuju mogućnost ovih procesa, čineći njihov uticaj na stabilnost floretina tokom eksperimentalnog perioda praktično zanemarljivim.

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da je floretin pokazao zadovoljavajuću stabilnost u aseptičnim uslovima *in vitro*, čime je omogućena pouzdana interpretacija podataka o dinamici metabolizma floretina i njegovim fiziološkim efektima na juvenilne biljke *A. thaliana*.

5.10. ANALIZA SADRŽAJA FLORETINA I NJEGOVIH DERIVATA U JUVENILNIM BILJKAMA

Primenom HPLC–MS analize utvrđeno je da juvenilne biljke *A. thaliana* intenzivno apsorbuju floretin iz hranljive podloge, vršeći njegovu metaboličku konverziju u glikozilovane derivate (florizin, trilobatin, floretin-diglikozid, acil-floretin-diglikozid i floretin-2-O-malonil-heksozid) već tokom prva 24 časa tretmana. Ovako efikasno usvajanje floretina verovatno je rezultat sinergije difuzije kroz ćelijsku membranu i njegovog aktivnog transporta. Pohl i saradnici (1997) su dokumentovali postojanje difuzije floretina kroz lipidni dvosloj, što je kasnije potvrđeno eksperimentima Karabulut i Toprak (2020), koji su zapazili njegovu akumulaciju u lumenu lecitin–fosfatidilholinskih lipozoma u ćelijama. Sa druge strane, podaci prikupljeni iz *in vitro* i *in vivo* studija na životinjskim modelima ukazali su na potencijalnu ulogu P-gp (eng. *P-glycoprotein*) i MRP2 (eng. *multidrug resistance protein 2*) transportera u aktivnom usvajanju i transportu floretina iz intestinalnih epitelijalnih ćelija (Yuan Zhao i sar., 2020). S obzirom na poznatu funkciju ABCC transportera (eng. *ATP-binding cassette subfamily C*) u translokaciji flavonoida kod biljaka (Pucker i Selmar, 2022), opravdano je pretpostaviti da analogni mehanizmi posreduju i u transportu floretina kroz ćelijske membrane epidermisa korena.

Nasuprot intenzivnom usvajanju floretina uočenom kod *A. thaliana*, Constantin i saradnici (2025b) su kod juvenilnih biljaka kukuruza (*Zea mays* L.) zabeležili kontinuirano usvajanje floretina iz hranljivog medijuma putem korena tokom prva dva dana tretmana. Međutim, autori nisu detektovali derivate floretina u listovima i korenovima tretiranih biljaka, uprkos primeni optimizovanih analitičkih protokola za sprečavanje hidrolize glikozidnih veza. Autori smatraju da

prisustvo floretina kod *Z. mays* u isključivo aglikonskom obliku i odsustvo njegove glikozilacije, može doprineti povišenoj bioaktivnosti ovog jedinjenja u citoplazmi i hloroplastima. Rezultati prezentovani u ovoj disertaciji pružaju jasne dokaze o ekstenzivnom metabolizmu floretina kod *A. thaliana*, ukazujući na to da strategije rane odbrane i odgovori na egzogene stimulanse mogu biti specifični za vrstu, što je verovatno uslovljeno taksonomskom pripadnošću.

Intenzivna glikozilacija apsorbovanog floretina može se smatrati primarnim korakom u procesu njegove detoksikacije kod *A. thaliana*. Analogan odbrambeni mehanizam prethodno je opisan pri detoksikaciji alelohemikalije benzoksazolin-2(3H)-ona (BOA) kod iste vrste, gde O-glikozilacija predstavlja dominantan metabolički put, dok alternativni pravac obuhvata direktnu N-glikozilaciju (Baerson i sar., 2005). Uopšteno, glikozilacija predstavlja široko rasprostranjen mehanizam u carstvu biljaka koji omogućava aktivnu regulaciju nivoa fiziološki aktivnih ili potencijalno štetnih jedinjenja njihovom konverzijom u hidrofilne i hemijski manje reaktivne molekule, što omogućava njihovo olakšano transportovanje i uspešno skladištenje u vakuoli (Jones i Vogt, 2001; Sirikantaramas i sar., 2008; Plaza i sar., 2014). Visoka diverzifikacija UDP-glikoziltransferaza (UGT) u tkivima *A. thaliana* omogućava sintezu širokog spektra glikozilovanih derivata flavonoida (Ross i sar., 2001; Tohge i Fernie, 2010). U skladu sa tim, HPLC/MS analizom sadržaja metabolita floretina u juvenilnim biljkama *A. thaliana* nakon tretmana floretinom, identifikovano je više glikozilovanih konjugata ovog dihidrohalkona, kao što su florizin, trilobatin, floretin-diglikozid, acil-floretin-diglikozid i floretin-2-O-malonil-heksozid. Sintaza ovih derivata potvrđuje da *A. thaliana* aktivno transformiše floretin primenom glikozilacije, acilacije i malonilacije kako bi se minimizovala njegova fitotoksičnost.

Uprkos inicijalnom povećanju sadržaja glikozida floretina u tretiranim juvenilnim biljkama, uočeno je njihovo progresivno opadanje tokom narednih dana tretmana, što je bilo naročito izraženo kod trilobatina, florizina i floretin-2-O-malonil-heksozida. Ovakva dinamika ukazuje na to da glikozilovani konjugati podležu daljoj metaboličkoj transformaciji, što rezultira nastankom jedinjenja sa izmenjenim hemijskim svojstvima. Poznato je da halkoni mogu ući u divergentne metaboličke puteve kod biljaka, najčešće konverzijom u naringenin (Díaz-Tielas i sar., 2016), ključni intermedijer u biosintezi flavona, izoflavona, flavonola, kondenzovanih tanina i antocijanina (Ayabe i Akashi, 2006; De La Rosa, 2009). S obzirom na strukturnu srodnost između dihidrohalkona i halkona, može se pretpostaviti da se analogne metaboličke transformacije mogu odigrati i nakon sinteze glikozilovanih derivata floretina, što može doprineti smanjenju njihovog sadržaja u juvenilnim biljkama *A. thaliana*.

Međutim, uzimajući u obzir fitotoksične efekte floretina opisane u okviru ove doktorske disertacije, evidentno je da procesi glikozilacije, kao i naknadna metabolička obrada glikozilovanih derivata floretina, nisu dovoljni za njegovu potpunu detoksikaciju. Ovakvo zapažanje je u saglasnosti sa rezultatima brojnih autora koji ukazuju na to da glikozilovana alelopatska jedinjenja mogu zadržati fitotoksičnu aktivnost, indukujući izražene morfološke i fiziološke promene kod tretiranih vrsta (Biswas i sar., 2017; Ladhari i sar., 2018; Novaes i sar., 2024). Takođe, uočeni pad sadržaja glikozilovanih derivata floretina oko desetog dana tretmana sugerise da ova jedinjenja podležu daljoj metaboličkoj konverziji u produkte koji ispoljavaju fitotoksično delovanje. U suprotnom, tj. u slučaju njihove potpune detoksikacije, bilo bi očekivano obnavljanje rastenja biljaka nakon završetka metaboličke obrade svih glikozilovanih derivata floretina. Međutim, dalja inhibicija rastenja i uginuće juvenilnih biljaka *A. thaliana*, naročito nakon produženog tretmana floretinom (28 dana), ukazuju na postojanje dodatnih metaboličkih procesa koji verovatno dovode do formiranja

fitotoksičnih intermedijera. Poznato je da akumulacija pojedinih flavonoida, poput kvercetina kod biljaka, može ispoljiti citotoksična svojstva, dovodeći do fragmentacije specifičnih proteina koji sadrže triptofan ili do oštećenja DNK (Ahmed i sar., 1994; Rueff i sar., 1995). Brojni mikroorganizmi sposobni za konverziju floretina, izolovani iz prirodne sredine ili humanog digestivnog trakta, mogu transformisati florizin u 3-(4-hidroksifenil)propionsku kiselinu i floroglucinol (Chatterjee i Gibbins, 1969; Frank i sar., 2014; Han i sar., 2019), jedinjenja koja mogu delovati kao alelohemikalije (Nakai i sar., 2001; Liu i sar., 2024). Stoga se ne može isključiti mogućnost da se slični, fitotoksično aktivni produkti formiraju i tokom metaboličke transformacije glikozilovanih derivata floretina kod *A. thaliana*.

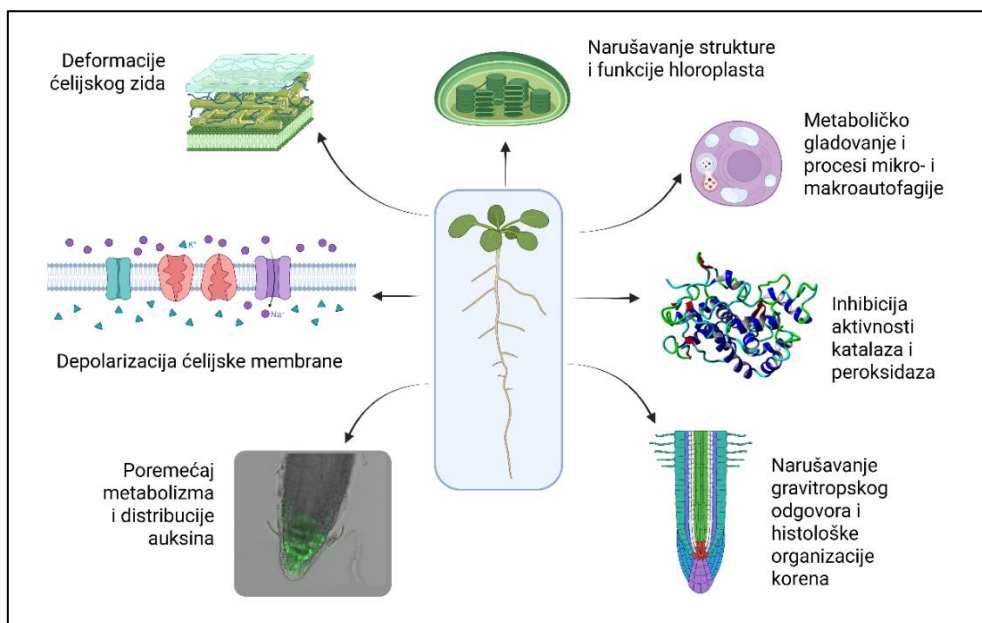
Sveukupno posmatrano, dobijeni rezultati ukazuju da egzogeno primenjen floretin indukuje intenzivan proces glikozilacije u juvenilnim biljkama *A. thaliana* kao ranu komponentu odbrambenog odgovora, nakon kojeg dolazi do opadanja nivoa glikozilovanih derivata floretina usled dalje metaboličke transformacije. Imajući u vidu prethodno opisane fitotoksične efekte floretina, ovi nalazi sugerišu da glikozilacija sama po sebi nije dovoljan mehanizam detoksikacije kod *A. thaliana*, te da su dodatne metaboličke modifikacije i/ili mehanizmi subćelijske kompartmentalizacije verovatno neophodni za ublažavanje njegove biološke aktivnosti.

5.11. PREDLOŽEN NAČIN DELOVANJA FLORETINA KOD *A. thaliana*

Rezultati istraživanja sprovedeni u okviru ove doktorske disertacije ukazuju da floretin ispoljava multimodalno inhibitorno delovanje na model-biljku *A. thaliana*. Efekti se manifestuju brzo i kumulativno, prožimajući različite nivoe biološke organizacije, od unutarćelijskih promena i histološke organizacije, do morfologije korenovog sistema i nadzemnih organa.

Kao primarni organ koji je u direktnom kontaktu sa alelohemikalijama iz rizosfere, koren predstavlja glavno mesto inicijalnog delovanja floretina (**Slika 59**). Jedan od najranijih zabeleženih odgovora je brza depolarizacija membrane epidermalnih ćelija korena. Elektrofiziološke analize sugerišu da floretin modifikuje jonske flukseve, čime narušava elektrohemijski gradijent neophodan za normalno funkcionisanje ćelija i verovatno predstavlja okidač za pokretanje ranih mehanizama detoksikacije kroz intenzivne procese glikozilacije, pretvarajući fitotoksični floretin u konjugovane oblike koji podležu daljoj metaboličkoj obradi. Rezultati ukazuju na to da, uprkos intenzivnom metabolisanju usvojenog floretina, ovi detoksifikacioni procesi nisu dovoljni za učinkovito neutralisanje njegovog fitotoksičnog delovanja kod *A. thaliana*.

Odsustvo povećanog sadržaja neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema, vodonik-peroksida i prolina, kao i smanjen sadržaj malondialdehida, ukazuje na to da floretin ne deluje primarno putem indukcije oksidativnog stresa, već specifičnim narušavanjem homeostaze i distribucije fitohormona auksina i destabilizacijom fotosintetskog procesa.



Slika 59. Šematski prikaz mehanizma delovanja i pratećih ćelijskih i fizioloških efekata floretina na model-biljci *A. thaliana*. Primarni biohemijski mehanizam floretina obuhvata inhibiciju aktivnosti antioksidativnih enzima (katalaza i peroksidaza) i depolarizaciju ćelijske membrane. Ovi početni molekularni događaji pokreću kaskadu nizvodnih efekata koji se manifestuju na ćelijskom nivou (deformacije ćelijskog zida, narušavanje strukture i funkcije hloroplasta, aktivacija mikro- i makroautofagije usled metaboličkog gladovanja), biohemijskom nivou (poremećaj metabolizma i distribucije auksina), kao i na makroskopskom nivou kroz narušavanje gravitropskog odgovora i histološke organizacije korena. Slika je kreirana u programu *BioRender* (<https://BioRender.com/b2oszif>, 5.5.2026).

Već kratkotrajno izlaganje floretinu (10 dana) dovodi do narušavanja strukture i fiziološke funkcionalnosti hloroplasta, što primorava biljku na razgradnju skrobnih rezervi radi održanja energetskog balansa. Sa dužim trajanjem tretmana (28 dana), ćelije ulaze u stanje metaboličkog „gladovanja” koje inicira procese mikro- i makroautofagije. Indukcija autofagije vodi ka eliminaciji disfunkcionalnih organela, smanjenju sadržaja fotosintetskih pigmenata i, u krajnjem stadijumu, ka programiranoj ćelijskoj smrti.

Ključni mehanizam fitotoksičnosti floretina ogleda se u narušavanju homeostaze i distribucije auksina u vrhovima korena juvenilnih biljaka (**Slika 59**). Zabeleženo višestruko povećanje sadržaja ovog fitohormona nakon tretmana floretinom ukazuje na narušavanje fino regulisane ravnoteže između sinteze, razgradnje, konjugacije i distribucije aktivnog auksina u korenu. Prekomerna akumulacija auksina i narušavanje njegove pravilne distribucije u vršnim delovima korena direktno dovode do inhibicije izduživanja primarnog korena, gubitka gravitropskog odgovora i vidljivih morfoloških deformacijam korenovog sistema.

5.12. PREDLOZI ZA BUDUĆI RAD I UPOTREBU FLORETINA

Potvrđeno fitotoksično delovanje floretina na model-biljci *A. thaliana* predstavlja čvrstu osnovu za dalja istraživanja u smeru razvoja novog, ekološki prihvatljivog herbicida. Dobijeni rezultati ukazuju na to da floretin poseduje izražen fitotoksičan potencijal, te se preporučuje nastavak istraživanja njegovog delovanja i na drugim vrstama, naročito na poljoprivredno značajnim korovskim vrstama i neciljanim organizmima, uključujući useve, insekte polinatore i zemljišne mikroorganizme.

Upotreba floretina za potencijalnu formulaciju novog bioherbicida u velikoj meri bi podrazumevala njegovu izolaciju iz prirodnih izvora, prvenstveno kultivara domaće jabuke (*Malus domestica* Borkh.). Floretin se može dobiti iz rezidbenih ostataka jabuke (sveže i suve grančice i listovi) putem deglikozilacije florizina, koji je prisutan u izrazito velikim količinama u tkivima jabuke (od 4 do 18% suve mase lista, u zavisnosti od sorte i sezone) (Mikulic Petkovšek i sar., 2009). Noviji pristup podrazumeva dobijanje floretina putem biosinteze u bakteriji *Escherichia coli*, primenom modularnog inženjeringa, nadogradnjom biosinteze L-tirozina do floretinske kiseline, uključujući optimizaciju enzimskih modula i strukturno vođenu mutagenezu (Liu i sar., 2022; Lee i sar., 2024). Primenom racionalnog dizajna konstruisan je i optimizovan biosintetski put za *de novo* sintezu floretina u *Saccharomyces cerevisiae*, pri čemu je potvrđeno da je efikasna produkcija ostvariva isključivo putem *p*-kumaril-CoA puta, uz postizanje prinosa od 287,2 mg L⁻¹ floretina (Han i sar., 2024b). Na ovaj način, proizvodnja floretina ili njegovih glikozida u bioreaktorima mogla bi obezbediti brz i isplativ pristup za njihovu primenu u praksi održive poljoprivrede.

Pored ispitivanja same aktivne supstance, neophodno je konstruisati odgovarajuću formulaciju bioherbicida koja bi bila dovoljno efikasna i stabilna za praktičnu primenu. Jedan od mogućih pravaca je kombinovanje floretina sa drugim alelohemikalijama, poput kafeinske i hlorogene kiseline, koje se prirodno nalaze u eksudatima korena jabuke (Stanišić i sar., 2019). Pretpostavlja se da bi sinergističko delovanje floretina i ovih jedinjenja moglo dovesti do povećanja ukupne herbicidne efikasnosti, uz smanjenje potrebnih doza pojedinačnih komponenti.

Da bi istraživanja o potencijalnoj primeni floretina bila potpuna, preporučuje se ispitivanje delovanja floretina na mikrobiom zemljišta, kao i ispitivanje stabilnosti floretina u različitim tipovima zemljišta. S obzirom na to da su floretin i florizin dominantne komponente eksudata jabuke (Stanišić i sar., 2019), podaci o uticaju zemljišta pogođenog ARD-om mogli bi biti vredni u proceni uticaja floretina na mikrobiom zemljišta. S obzirom da ARD menja mikrofloru na korist štetnih mikroorganizama za jabuku (Otto i sar., 1994; Utkhede, 2006; Radl i sar., 2019), bilo bi korisno ispitati delovanje samog floretina na druge zemljišne mikroorganizme. Rezultati Pedrinho i sar. (2024) ukazuju na to da dihidrohalkon može izazvati izraženo dozno-zavisno smanjenje broja bakterijskih sojeva u određenim tipovima zemljišta, što naglašava značaj edafskih faktora u modulaciji ovog efekta. Nasuprot tome, populacije gljiva su ostale stabilne, dok su amonijak-oksidujući mikroorganizmi pokazali varijabilne promene, usko povezane sa tipom zemljišta, što ukazuje na potencijalni uticaj dihidrohalkona na kruženje azota.

S druge strane, prirodna zemljišta bogata mikroorganizmima predstavljaju visoko interaktivnu celinu, te nije isključeno da bi delovanje nekih bakterija ili gljiva moglo da dovede do razgradnje i inaktivacije floretina. Na primer, poznato je da kosmopolitska zemljišna bakterija *Sphingobium*

herbicidovorans može da razgradi brojne hemikalije u okruženju, uključujući aromatična i hlороaromatična jedinjenja, fenole, herbicide i policiklične uglјovodonike (Lal i sar., 2006). Pored toga, specifični sojevi bakterija, poput *Ochrobactrum haematophilum* (soj W6), pokazuju visoku sposobnost razgradnje floretina i florizina, što značajno skraćuje njihovo vreme poluživota u zemlјištu voćnjaka jabuka pogođenih ARD-om (Jiang i sar., 2023). Efikasnost floretina kao potencijalnog bioherbicida u realnim uslovima direktno zavisi od njegove stabilnosti i perzistentnosti u zemlјištu. Aktuelna istraživanja (Pedrinho i sar., 2024; Dziągwa-Becker i sar., 2024a) ukazuju da dihidrohalkoni poseduju nisku stabilnost, sa vremenom poluraspada koje varira od 0,85 do 10,23 dana, zavisno od tipa zemlјišta i mikrobne aktivnosti. Nizak koeficijent particije dihidrohalkona pinocembrina (0,0661) sugerіše slab afinitet prema česticama zemlјišta, što povećava rizik od njegovog brzog ispiranja u dublje slojeve, čime se smanjuje njegova dugoročna fitotoksična efikasnost na površinskom sloju (Dziągwa-Becker i sar., 2024a). U skladu sa tim, potrebno je ispitati uticaj floretina na mikrobne zajednice zemlјišta, njihove funkcionalne uloge i šire ekološke implikacije. Takva istraživanja su ključna za određivanje izvodljivosti i efikasnosti floretina kao alata u održivim polјoprivrednim praksama.

S obzirom na relativno kratak poluživot i slabu adsorpciju dihidrohalkona za čestice zemlјišta, neophodno je ispitati primenu „zelenih rastvarača” i formulacija koje bi poboljšale rastvorljivost i zaštitile floretin od degradacije. Razumevanje ovih procesa je preduslov za prelazak sa *in vitro* modela na testiranja u staklenicama i polјskim uslovima, kako bi se osigurala pouzdanost floretina kao ekološki prihvatljivog bioherbicida. Budući pravci istraživanja floretina neizbežno vode ka primeni nanotehnoloških pristupa, koji imaju potencijal da prevaziđu ključne barijere u njegovoj primeni – nisku biodostupnost i brzu degradaciju u spoljašnjoj sredini. Razvoj nanosuspenzija i inkluzionih kompleksa nudi strateško rešenje za kontrolisano oslobađanje i povećanu efikasnost ove aktivne supstance. Nekoliko studija priјavilo je uspešnu enkapsulaciju floretina i/ili florizina korišćenjem ciklodekstrina. Upotreba biokompatibilnih ciklodekstrina (poput hidroksipropil- β i metil- β varijanti) značajno je poboljšala rastvorljivost floretina u vodi i očuvala, pa čak i pojačala, njegov antioksidativni kapacitet (Hu i sar., 2020; Aree i sar., 2023). Takođe, primena jonske gelacije za kreiranje nanočestica (Sharma i sar., 2024) i polimernih mikrosfera na bazi galne kiseline (Cassano i sar., 2023) pokazala je izvanredne rezultate u kontrolisanom oslobađanju floretina u medicinskim i farmakološkim studijama. Posebno inovativan pristup predstavlja razvoj ternarnih nanokompleksnih čestica na bazi modifikovanog fitoglikogena, natriјum-kazeinata i pektina, koji obezbeđuju sporo i produženo oslobađanje floretina uz značajno unapređenje njegove biološke aktivnosti u vodenim rastvorima (Chen i sar., 2020). Iako su ovi modeli primarno razvijeni za biomedicinske svrhe, njihova adaptacija za polјoprivrednu primenu mogla bi drastično povećati perzistentnost floretina u rizosferi. S obzirom na to da nanotehnološki formulisani floretin pokazuje višestruko veću biološku aktivnost u poređenju sa slobodnim oblikom, to bi u agrotehničkom smislu značilo manju potrebnu dozu za postizanje željenog herbicidnog ili pesticidnog efekta.

Pored ispitivanja delovanja floretina na mikrobiom zemlјišta, neophodno je ispitati njegov uticaj na insekte polinatore, naročito pčele i druge oprašivače. Prethodne studije floretina i florizina na insektima bile su fokusirane na njihovu ulogu u zaštiti od herbivornih insekata kod različitih sorti jabuke. Rezultati ukazuju da florizin može imati dvojaku funkciju: kao repelent i atraktant, u zavisnosti od vrste insekta (Klingauf, 1971; Patton i sar., 1997; Fulcher i sar., 1998; Gutbrodt i sar., 2011; Winkelmann i sar., 2019). Insekticidni potencijal floretina i njegovih glikozida zasniva se na dva ključna biohemijska mehanizma: inhibiciji trehaloze i hormonskoј interferenciji. Kao primarni

izvor energije i krioprotektant u hemolimfi, trehaloza je neophodna za nutritivnu homeostazu insekata (Thompson, 2003). S obzirom na njen značaj, svako narušavanje metabolizma trehaloze negativno utiče na metabolizam insekata, dovodeći do ozbiljnih razvojnih i lokomotornih smetnji (Takahashi i sar., 1995; Kono i sar., 1997; Wegener i sar., 2003; Silva i sar., 2006). S druge strane, poznato je da floretin ispoljava dozno-zavisnu inhibiciju ekdizon 20-monooksigenaze, enzima ključnog za sintezu ekdisterona, hormona koji reguliše metamorfozu, presvlačenje i biosintezu feromona kod insekata (Mitchell i sar., 1993; Gilbert, 2004). U svetlu ovih kompleksnih metaboličkih i hormonskih efekata, od vitalnog značaja je utvrditi da li floretin predstavlja rizik za populacije oprašivača. Razumevanje ovih interakcija je nezaobilazan korak u proceni bezbednosti floretina za primenu u realnim poljoprivrednim uslovima, kako bi se osiguralo da njegova upotreba kao bioherbicida ne naruši stabilnost ekosistema.

Proces razvoja i komercijalizacije novih herbicida predstavlja složenu, višestepenu proceduru koja zahteva strogo definisan redosled testiranja (Vrbničanin i Šinžar, 2003). U tom kontekstu, rezultati ove disertacije čine inicijalnu fazu (skrining na modelu *A. thaliana*), dok bi se dalja istraživanja floretina morala fokusirati na ispitivanja u kontrolisanim uslovima na semenu većeg broja ekonomski značajnih monokotiledonih i dikotiledonih korovskih vrsta. Tek nakon potvrde fitotoksičnog praga i optimizacije doza, istraživanja bi trebalo proširiti na neciljne organizme, uz konačno sprovođenje odgovarajućih poljskih, razvojnih i registracionih ogleda (Vrbničanin i Šinžar, 2003). Važno je istaći da, uprkos naučnom potencijalu, dizajniranje bioherbicida, iako zasnovano na akademskom pristupu, u velikoj meri je uslovljeno tržišnom prihvatljivošću i potrebama krajnjih korisnika (Krähmer i sar., 2021).

S obzirom na složenost i dugotrajnost opisanih procesa, dalji rad na razvoju potencijalnog bioherbicida na bazi floretina zahteva sistematičan pristup kroz više istraživačkih ciklusa. Kontinuitet u ispitivanju, koji bi uključio naredne generacije studenata i istraživača, obezbedio bi neophodnu bazu znanja za transformaciju floretina iz potentnog bioaktivnog molekula u održivo i ekološki bezbedno rešenje za zaštitu biljaka u savremenoj poljoprivredi.

6. ZAKLJUČAK

Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije daju preliminarnu sliku o kompleksnosti efekata koje tretman floretinom izaziva kod model vrste *A. thaliana*, kao i pretpostavke o nekim od mogućih mehanizama njegovog fitotoksičnog delovanja. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da floretin deluje kao multimodalni inhibitor, čiji se efekti manifestuju kroz kaskadu morfoloških, fizioloških, metaboličkih i ultrastrukturnih promena.

Na osnovu sprovedenih analiza, definisani su sledeći ključni aspekti delovanja floretina:

- Floretin ispoljava izražen inhibitorni efekat na rastenje i razviće tretiranih biljaka *A. thaliana*.
 - Korenov sistem predstavlja primarno mesto delovanja floretina i na njemu se zapažaju najizraženije morfološke promene sa jasnim dozno-zavisnim karakterom, koje se manifestuju kroz inhibiciju izduživanja primarnog korena i smanjenu indukciju bočnih korenova.
 - Tretman floretinom dovodi do dozno-zavisne inhibicije izduživanja izdanaka, redukcije broja listova i pojave hloroze.
 - Produženi tretman u trajanju od 28 dana rezultira značajnom inhibicijom rastinja i razvića biljaka, praćenom izostankom cvetanja, pojavom hloroze i progresivnim uvenućem.
 - Usvajanje floretina putem korenovog sistema rezultira dozno-zavisnim smanjenjem sveže mase korena i izdanaka, što implicira njegovu translokaciju iz korena u nadzemne delove biljke.
- Inicijalna faza delovanja floretina je obeležena brзом depolarizacijom membrane epidermalnih ćelija korena i narušavanjem elektrohemijskog gradijenta neophodnog za normalno funkcionisanje ćelija.
- Tretman floretinom narušava percepciju gravitacione sile u korenu, što se manifestuje smanjenjem broja i veličine amiloplasta u ćelijama kolumele, indukcijom agravitropskog fenotipa i redukcijom vertikalnog gravitropskog indeksa biljaka.
- Tretman floretinom narušava histološku organizaciju i funkcionalni integritet apikalnog dela korena, što se manifestuje kroz izmenu strukture apikalnog dela korenove kape i kolumele, kao i skraćanjem meristemske i elongacione zone i oštećenjem epidermisa korena.
- Produženi tretman floretinom indukuje značajne ultrastrukturne promene mezofilnih ćelija primarno manifestovane kroz modifikacije ćelijskog zida, dezorganizaciju organela i pojavu piknotičkih nukleusa. Detektovana oštećenja strukture hloroplasta, smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata i iscrpljivanje skrobnih rezervi ukazuju na narušavanje fotosintetskih procesa, energetske deficit i stanje fiziološkog gladovanja, što posledično inicira procese mikro- i makroautofagije.
- Floretin fundamentalno narušava homeostazu između fino regulisanih procesa biosinteze, razgradnje i konjugacije auksina, rezultujući u akumulaciji aktivnog auksina i njegovoj abnormalnoj distribuciji u vršnim delovima korena, što leži u osnovi inhibicije izduživanja primarnog korena, gubitka gravitropskog odgovora i morfološkim deformacijama korenovog sistema.
- Mehanizam delovanja floretina nije primarno zasnovan na indukciji oksidativnog stresa. Kao jedinjenje sa značajnim antioksidativnim potencijalom, floretin indukuje povećanje

antioksidativnog kapaciteta, smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima i smanjenje sadržaja malondialdehida u tretiranim biljkama.

- Floretin deluje kao kompetitivni inhibitor peroksidaze, uspostavljaajući stabilne vodonične veze sa aminokiselinskim ostacima iz katalitičkog regiona, posebno sa Arg38 i Ala140, uz visok afinitet vezivanja ($-8,307 \text{ kcal mol}^{-1}$).
- Kod katalaze je identifikovana mešovita inhibicija sa dominantnom nekompetitivnom komponentom, uslovljena stabilnim vezivanjem floretina za NADP(H) regiju enzima ($-7,708 \text{ kcal mol}^{-1}$) uspostavljanjem vodoničnih veza sa Arg 203 i Tyr 215 aminokiselinskim ostacima.
- Egzogeni aplikacija floretina inicira proces intenzivne glikozilacije kao rani odbrambeni odgovor tretiranih juvenilnih biljaka. Naknadni pad sadržaja glikozilovanih derivata floretina (florizina, trilobatina, floretin-diglikozida, acil-floretin-diglikozida i floretin-2-O-malonil-heksozida) ukazuje da glikozilacija sama po sebi nije dovoljan mehanizam detoksikacije, te da su dodatne metaboličke modifikacije i/ili mehanizmi subćelijske kompartmentalizacije verovatno neophodni za ublažavanje njegove biološke aktivnosti.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da floretin deluje kao multimodalni inhibitor koji narušava ključne morfološke, fiziološke i metaboličke procese u biljkama *A. thaliana*, uključujući rastenje, gravitropizam, hormonsku homeostazu i ćelijsku organizaciju. Takav širok spektar delovanja, uz izražen fitotoksični potencijal, ukazuje na značajnu perspektivu primene floretina i njegovih derivata u razvoju efikasnih i ekološki prihvatljivih bioherbicida.

7. LITERATURA

- Abbas, S., Javed, M. T., Ali, Q., Azeem, M., Ali, S. (2021). Nutrient deficiency stress and relation with plant growth and development. In: Fahad, S., Sönmez, O., Saud, S., Wang, D., Wu, C., Adnan, M., Arif, M., Amanullah, (eds.) Engineering tolerance in crop plants against abiotic stress. CRC Press, pp. 239-262.
- Abd El-Gawad, A. M. (2016). Chemical constituents, antioxidant and potential allelopathic effect of the essential oil from the aerial parts of *Cullen plicata*. Industrial Crops and Products, 80, 36-41.
- Abraham, D., Braguini, W. L., Kelmer-Bracht, A. M., Ishii-Iwamoto, E. L. (2000). Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. Journal of Chemical Ecology, 26 (3), 611-624.
- Abu, N., Ho, W. Y., Yeap, S. K., Akhtar, M. N., Abdullah, M. P., Omar, A. R., Alitheen, N. B. (2013). The flavokawains: Uprising medicinal chalcones. Cancer Cell International, 13, 102.
- Abu-Romman, S., Ammari, T. (2015). Allelopathic effect of 'Arundo donax', a mediterranean invasive grass. Plant Omics, 8 (4), 287-291.
- Adamov, T., Sremački, M., Novaković, M., Mihajlović, I., Petrović, M. (2020). Identifikacija i procena izvora emisije glifosata u ocednoj vodi zaštićenih vodnih tela u Srbiji i Hrvatskoj. Zbornik radova Fakulteta tehničkih nauka u Novom Sadu, 35 (05), 961-964.
- Ade Lu Ji, A. L., Zhou Jian, Z. J., Li Jie, L. J., Ma Dan Wei, M. D. (2018). Effect of allelochemical stress from *Chenopodium ambrosioides* L. on chloroplast ultrastructure and photosynthetic key gene expression in leaves of *Vicia faba* seedlings. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 31 (12), 2527-2532.
- Adinortey, M. B., Ansah, C., Adinortey, C. A., McGiboney, J., Nyarko, A. (2018). *In vitro* H⁺/K⁺-ATPase inhibition, antiradical effects of a flavonoid-rich fraction of *Dissotis rotundifolia*, and in silico PASS prediction of its isolated compounds. Journal of Natural Science, Biology and Medicine, 9 (1), 47.
- Aebi, H. E. (1983). Catalase. In: Bergmeyer, H. U. (ed.) Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 273- 286.
- Afnan, Saleem, A., Akhtar, M. F., Sharif, A., Akhtar, B., Siddique, R., Ashraf, G. M., Alghamdi, B. S., Alharthy, S. A. (2022). Anticancer, cardio protective and anti-inflammatory potential of natural-sources-derived phenolic acids. Molecules, 27 (21), 7286.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. Plant Science, 196, 67-76.
- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Azooz, M. M., Nabi, G. (2009). Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. Botany Research International, 2, 11-20.
- Ahmed, M. S., Ramesh, V., Nagaraja, V., Parish, J. H., Hadi, S. M. (1994). Mode of binding of quercetin to DNA. Mutagenesis, 9 (3), 193-197.

- Ajiboye, T. O., Yakubu, M. T., Oladiji, A. T. (2014). Cytotoxic, antimutagenic, and antioxidant activities of methanolic extract and chalcone dimers (Lophirone B and C) derived from *Lophira alata* (Van Tiegh. Ex Keay) stem bark. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 19, 20–30.
- Aki, C., Güneysu, E., Acar, O. (2009). Effect of industrial wastewater on total protein and the peroxidase activity in plants. *African Journal of Biotechnology*, 8 (20).
- Aldasoro, J. J., Aedo, C., Navarro, C. (2005). Phylogenetic and phytogeographical relationships in Maloideae (Rosaceae) based on morphological and anatomical characters. *Blumea: Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 50, 3-32.
- Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., Rovira, C. (2009). The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 131 (33), 11751-11761.
- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60 (2), 377-390.
- Almarsson, Ö., Sinha, A., Gopinath, E., Bruice, T. C. (1993). Mechanism of one-electron oxidation of NADPH and function of NADPH bound catalase. *Journal of the American Chemical Society*, 115, 7093-7102.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53 (372), 1331-1341.
- Álvarez, F., Arena, M., Auteri, D., Borroto, J., Brancato, A., Carrasco Cabrera, L., et. al. (2021). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pelargonic acid (nonanoic acid). *EFSA Journal*, 19 (8), e06813.
- Álvarez, F., Arena, M., Auteri, D., Leite, S. B., Binaglia, M., Castoldi, A. F., et. al.. (2025). Updated peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pelargonic acid (nonanoic acid). *EFSA Journal*, 23 (6), e9408.
- Anaya, A. L., Pelayo-Benavides, H. R. (1997). Allelopathic potential of *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae): effects on germination, growth and cell division of some plants. *Allelopathy Journal*, 4, 57–68.
- Anjum, S. A., Tanveer, M., Hussain, S., Shahzad, B., Ashraf, U., Fahad, S., et. al. (2016). Osmoregulation and antioxidant production in maize under combined cadmium and arsenic stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 11864-11875.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408 (6814), 796-815.
- Araniti, F., Bruno, L., Sunseri, F., Pacenza, M., Forgione, I., Bitonti, M. B., et. al. (2017). The allelochemical farnesene affects *Arabidopsis thaliana* root meristem altering auxin distribution. *Plant Physiology and Biochemistry*, 121, 14-20.
- Araniti, F., Costas-Gil, A., Cabeiras-Freijanes, L., Lupini, A., Sunseri, F., Reigosa, M. J., et. al. (2018). Rosmarinic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* seedlings through reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction. *PLoS ONE*, 13 (12), e0208802.

- Araniti, F., Miras-Moreno, B., Lucini, L., Landi, M., Abenavoli, M. R. (2020). Metabolomic, proteomic and physiological insights into the potential mode of action of thymol, a phytotoxic natural monoterpenoid phenol. *Plant Physiology and Biochemistry*, 153, 141-153.
- Araus, J. L., Amaro, T., Voltas, J., Nakkoul, H., Nachit, M. M. (1998). Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions". *Field Crops Research*, 55, 209-223.
- Arc, E., Galland, M., Godin, B., Cuef, G., Rajjou, L. (2013). Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4, 346.
- Aree, T. (2023). How cyclodextrin encapsulation improves molecular stability of apple polyphenols phloretin, phlorizin, and ferulic acid: Atomistic insights through structural chemistry. *Food Chemistry*, 409, 135326.
- Arnao, M. B., Cano, A., Acosta, M. (1999). Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Research*, 31, 89–96.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601–639.
- Ash, G. J. (2010). The science, art and business of successful bioherbicides. *Biological Control*, 52 (3), 230-240.
- Ashraf, M. J. B. A. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*, 27 (1), 84-93.
- Avin-Wittenberg, T. (2018). Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant, Cell and Environment*, 42 (3), 1045-1053.
- Ayabe, S. I., Akashi, T. (2006). Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochemistry Reviews*, 5 (2), 271-282.
- Baerson, S. R., Sánchez-Moreiras, A., Pedrol-Bonjoch, N., Schulz, M., Kagan, I. A., Agarwal, A. K., et. al. (2005). Detoxification and transcriptome response in *Arabidopsis* seedlings exposed to the allelochemical benzoxazolin-2 (3H)-one. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (23), 21867-21881.
- Bahmani, R., Kim, D. G., Modareszadeh, M., Thompson, A. J., Park, J. H., Yoo, H. H., et. al. (2020). The mechanism of root growth inhibition by the endocrine disruptor bisphenol A (BPA). *Environmental Pollution*, 257, 113516.
- Bai, R., Zhao, X., Ma, F., Li, C. (2009). Identification and bioassay of allelopathic substances from the root exudates of *Malus prunifolia*. *Allelopathy Journal*, 23, 477–484.
- Baldwin, K. L., Strohm, A. K., Masson, P. H. (2013). Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots. *American Journal of Botany*, 100, 126–142.
- Baldwin, R. E. (1953). The mode of action of O-isopropyl N-phenyl carbamate as an herbicide. Oregon State College. (master teza)
- Ball, S. G., Morell, M. K. (2003). From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 207.

- Bao, F., Shen, J., Brady, S. R., Muday, G.K., Asami, T., Yang, Z. (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134, 1624–1631.
- Barany, I., Berenguer, E., Solis, M. T., Perez-Perez, Y., Santamaria, M. E., Crespo, J. L., et. al. (2018). Autophagy is activated and involved in cell death with participation of cathepsins during stress-induced microspore embryogenesis in barley. *Journal of Experimental Botany*, 69 (6), 1387–1402.
- Barreca, D., Bellocco, E., Laganà, G., Ginestra, G., Bisignano, C. (2014). Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chemistry*, 160, 292–297.
- Batish, D. R., Singh, H. P., Setia, N., Kaur, S., Kohli, R. K. (2006). 2-Benzoxazolinone (BOA) induced oxidative stress, lipid peroxidation and changes in some antioxidant enzyme activities in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 44 (11-12), 819-827.
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65 (5), 1229-1240.
- Baziramakenga, R., Simard, R. R., Leroux, G. D. (1994). Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition, and chlorophyll content of soybean. *Journal of Chemical Ecology*, 20 (11), 2821-2833.
- Bažulić Štimac, Ž., Ranogajec, A., Krivohlavek, A., Mandić, I., Šmit, Z., Puntarić, D. (2006). Atrazin u okolišu-zdravstveni rizik (Atrazine in the Environment-A Health Risk). *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 2 (8), 0-0.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44 (1), 276 – 287.
- Behzad, S., Sureda, A., Barreca, D., Nabavi, S. F., Rastrelli, L., Nabavi, S. M. (2017). Health effects of phloretin: from chemistry to medicine. *Phytochemistry Reviews*, 16 (3), 527-533.
- Belyavskaya, N. A. (2004). Biological effects due to weak magnetic field on plants. *Advances in Space Research*, 34 (7), 1566-1574.
- Benigni, R., Bignami, M., Carere, A., Conti, G., Conti, L., Crebelli, R., et. al. (1979). Mutational studies with diquat and paraquat in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 68 (3), 183-193.
- Benková, E., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S., Dubrovsky, J. G. (2009). A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? *Trends in plant science*, 14 (4), 189-193.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jürgens, G., Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115, 591–602.
- Ben-Othman, S., Kaldmäe, H., Rätsep, R., Bleive, U., Aluvee, A., Rinken, T. (2021). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phloretin and other phenolic compounds from apple tree leaves (*Malus domestica* Borkh.) and comparison of different cultivars from Estonia. *Antioxidants*, 10 (2), 189.

- Bentes, A. L., Borges, R. S., Monteiro, W. R., De Macedo, L. G., Alves, C. N. (2011). Structure of dihydrochalcones and related derivatives and their scavenging and antioxidant activity against oxygen and nitrogen radical species. *Molecules*, 16 (2), 1749-1760.
- Bentsink, L., Koornneef, M. (2008). Seed dormancy and germination. *Arabidopsis Book*, 6, e0119.
- Berckmans, B., De Veylder, L. (2009). Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 599–605.
- Berestetskiy, A. (2023). Modern approaches for the development of new herbicides based on natural compounds. *Plants*, 12 (2), 234.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9, 1055–1066.
- Billou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Frimi, J., et al. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 433, 39–44.
- Biswas, S. M., Chakraborty, N., Patra, S. R., Bhowmik, P. C. (2017). A new phenol glycoside from root exudates of *peperomia pellucida* l. Hbk. And its role in plant invasion. *Annals of Tropical Research*, 39 (2), 13-24.
- Blakely, L. M., Evans, T. A. (1979). Cell dynamics studies on the pericycle of radish seedling roots. *Plant Science Letters*, 14 (1), 79-83.
- Blancaflor, E. B., Fasano, J. M., Gilroy, S. (1998). Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. *Plant Physiology*, 116, 213–222.
- Blatt, M. R. (2024). A charged existence: a century of transmembrane ion transport in plants. *Plant Physiology*, 195 (1), 79-110.
- Blum, A., Ebercon, A. (1976) *Crop Science*, 16, 428-431.
- Bohnert H. J., Nelson D. E., Jensen R. G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 7, 1099–1111.
- Bonny, S. (2016). Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: overview and impact. *Environmental Management*, 57 (1), 31-48.
- Börner, H. (1959). The apple replant problem. I. The excretion of phlorizin from apple root residues. *Contributions from Boyce Thompson Institute*, 20, 39–56.
- Börner, H. (1960). Liberation of organic substances from higher plants and their role in the soil sickness problem. *The Botanical Review*, 26, 393–424.
- Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Frankart, C., Reboutier, D., Madiona, K., Pennarun, A. M., et al. (2006). Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New Phytologist*, 169, 209–218.
- Boyetchko, S. M., Roskopf, E. N., Caesar, A. J., Charudattan, R. (2002). Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. *Agriculture and Food Production*, 2, 239–266.
- Bradberry, S. M., Proudfoot, A. T., Vale, J. A. (2004). Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews*, 23 (3), 159-167.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brady, S. M., Sarkar, S. F., Bonetta, D., McCourt, P. (2003). The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 34 (1), 67-75.
- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, W. A., et. al. (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126, 524–535.
- Brumos, J., Alonso, J. M., Stepanova, A. N. (2014). Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiologia Plantarum*, 151, 3–12.
- Brunkard, J. O., Burch-Smith, T. M. (2018). Ties that bind: the integration of plastid signalling pathways in plant cell metabolism. *Essays in Biochemistry*, 62 (1), 95-107.
- Brunoud, G., Wells, D. M., Oliva, M., Larrieu, A., Mirabet, V., Burrow, A. H., et. al. (2012). A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature*, 482 (7383), 103-106.
- Buer, C. S., Muday, G. K., Djordjevic, M. A. (2007). Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145, 478–490.
- Burgos, N. R., Talbert, R. E., Kim, K. S. Kuk, Y. I. (2004). Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *Journal of Chemical Ecology*, 30, 671-689.
- Burton, R. A., Gibeaut, D. M., Bacic, A., Findlay, K., Keith, R., Hamilton, A., et. al. (2000). Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell*, 12, 691–706.
- Calderón Villalobos, L. I. A., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., et. al. (2012). A combinatorial TIR1/AFB–Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology*, 8 (5), 477-485.
- Calera, M. R., Anaya, A. L., Gavilanes-Ruiz, M. (1995). Effect of phytotoxic resin glycoside on activity of H⁺-ATPase from plasma membrane. *Journal of Chemical Ecology*, 21 (3), 289-297.
- Campe, R., Hollenbach, E., Kämmerer, L., Hendriks, J., Höken, H. W., Kraus, H., et al. (2018). A new herbicidal site of action: Cinmethylin binds to acyl-ACP thioesterase and inhibits plant fatty acid synthase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 148, 116–125.
- Carillo, P., Gibon, Y. (2011). Protocol: Extraction and determination of proline. *Prometheus Wiki*, 1-5.
- Carpita, N. C., Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 3, 1–30.
- Casarini, T. P. A., Frank, L. A., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S. (2020). Dermatological applications of the flavonoid phloretin. *European Journal of Pharmacology*, 889, 173593.

- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., et. al. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root development. *Plant Cell*, 13, 843–852.
- Caspar, T., Pickard, B. G., Caspar, T., Pickard, B. G. (1989). Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis*. *Planta*, 177, 185–197.
- Cassano, R., Curcio, F., Sole, R., Trombino, S. (2023). Transdermal delivery of phloretin by gallic acid microparticles. *Gels*, 9 (3), 226.
- Celenza, J. J., Grisafi, P. L., Fink, G. R. (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, 9 (17), 2131-2142.
- Chang, W. T., Huang, W. C., Liou, C. J. (2012). Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Food Chemistry*, 134 (2), 972-979.
- Chanliaud, E., Burrows, K. M., Jeronimidis, G., Gidley, M. J. (2002). Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta*. 215, 989–996.
- Chatterjee, A. K., Gibbins, L. N. (1969). Metabolism of phloridzin by *Erwinia herbicola*: nature of the degradation products, and the purification and properties of phloretin hydrolase. *Journal of Bacteriology*, 100 (2), 594-600.
- Chauvel, B., Gauvrit, C., Guillemin, J. P. (2022). From sea salt to glyphosate salt: a history of herbicide use in France. *Advances in Weed Science*, 40 (spe 1), e020220015.
- Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., Subhadhirasakul, S., Tewtrakul, S. (2006). Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14 (6), 1710-1714.
- Chen, J., Li, Q., Ye, Y., Huang, Z., Ruan, Z., Jin, N. (2020). Phloretin as both a substrate and inhibitor of tyrosinase: Inhibitory activity and mechanism. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 226, 117642.
- Chen, W. J., Yun, M. S., Deng, F., Yogo, Y. (2005). The rates of maize growth and lignin biosynthesis change after root-applied chalcone. *Weed Biology and Management*, 5 (3), 118-122.
- Chen, W. J., Yun, M. S., Deng, F. (2004). Effects of root-applied naringenin and chalcone on the growth of annual plants. *Weed Biology and Management*, 4 (4), 235–238.
- Chen, W. J., Yun, M. S., Deng, F., Yogo, Y. (2011). Chalcone suppresses lignin biosynthesis in illuminated soybean cells. *Weed Biology and Management*, 11, 49-56.
- Chen, Y., Xue, J., Luo, Y. (2020). Encapsulation of phloretin in a ternary nanocomplex prepared with phytoglycogen–caseinate–pectin via electrostatic interactions and chemical cross-linking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68 (46), 13221-13230.
- Cheng, F., Cheng, Z. (2015). Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science*, 6 (1-16), 1020.
- Cheng, Y. F., Dai, X. H., Zhao, Y. D. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 20, 1790–1799.

- Chiang, H. H., Dandekar, A. M. (1995). Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant, Cell and Environment*, 18, 1280–1290.
- Cho, M., Lee, Z. W., Cho, H. T. (2012). ATP-binding cassette B4, an auxin-efflux transporter, stably associates with the plasma membrane and shows distinctive intracellular trafficking from that of PIN-FORMED proteins. *Plant Physiology*, 159, 642–654.
- Choi, B. Y. (2019). Biochemical basis of anti-cancer-effects of phloretin—A natural dihydrochalcone. *Molecules*, 24 (2), 278.
- Chotsaeng, N., Laosinwattana, C., Charoenying, P. (2019). Herbicidal activity of flavokawains and related trans-chalcones against *Amaranthus tricolor* L. and *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. *ACS Omega*, 4, 20748-20755.
- Chowhan, N., Bali, A. S., Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K. (2014). Reactive oxygen species generation and antioxidant defense system in hydroponically grown wheat (*Triticum aestivum*) upon β -pinene exposure: an early time course assessment. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36 (12), 3137-3146.
- Christensen, S. K., Dagenais, N., Chory, J., Weigel, D. (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell*, 100 (4), 469-478.
- Ciarmiello, L. F., Mazzeo, M. F., Minasi, P., Peluso, A., De Luca, A., Piccirillo, P., et/ al. (2014). Analysis of different European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars: authentication, phenotypic features, and phenolic profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 6236-6246.
- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Ilharco, L. M., Pagliaro, M. (2019). Herbicides based on pelargonic acid: Herbicides of the bioeconomy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13 (6), 1476-1482.
- Clark, N. M., de Luis Balaguer, M. A., Sozzani, R. (2014). Experimental data and computational modeling link auxin gradient and development in the Arabidopsis root. *Frontiers in Plant Science*, 5, 328.
- Constantin, R. P., de Melo, G. S. R., Contesoto, I. D. C., Greco, M. G., da Silva, J. J. S., Comar, A. C., et. al. (2025a). Phloretin as a C4 photosynthesis disruptor: Metabolic, enzymatic, and physiological insights. *Plant Physiology and Biochemistry*, 229, 110759.
- Constantin, R. P., de Souza, M. C., Abrahão, J., Foletto-Felipe, M. D. P., Grizza, L. H. E., Ferro, A. P., et. al. (2025b). Phytotoxicity and mode of action of phloretin on maize seedlings. *Journal of plant growth regulation*, 44 (7), 3916-3936.
- Cordeau, S., Triolet, M., Wayman, S., Steinberg, C., Guillemin, J. P. (2016). Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop protection*, 87, 44-49.
- Corpas, F. J. (2015). What is the role of hydrogen peroxide in plant peroxisomes? *Plant Biology*, 17 (6), 1099-1103.
- Cosio, C., Dunand, C. (2009). Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, 60 (2), 391-408.

- Costa, M., Sezgin-Bayindir, Z., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F., Saso, L., Bravo-Díaz, C. (2021). Polyphenols as antioxidants for extending food shelf-life and in the prevention of health diseases: encapsulation and interfacial phenomena. *Biomedicines*, 9 (12), 1909.
- Costes, E., Lauri, P. E., Simon, S., Andrieu, B. (2013). Plant architecture, its diversity and manipulation in agronomic conditions, in relation with pest and pathogen attacks. *European Journal of Plant Pathology*, 135 (3), 455-470.
- Crawford, D. J., Stuessy, T. F. (1981). The taxonomic significance of anthochlors in the subtribe Coreopsidinae (Compositae, Heliantheae). *American Journal of Botany*, 68, 107–117.
- Crumpton-Taylor, M., Grandison, S., Png, K. M. Y., Bushby, A. J., Smith, A. M. (2012). Control of starch granule numbers in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Physiology*, 158, 905–916.
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A. L., Hernández-Bautista, B. E. Laguna-Hernández, G. (1998). Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 2039-2057.
- Cuendet, M., Potterat, O., Salvi, A., Testa, B., Hostettmann, K. (2000). A stilbene and dihydrochalcones with radical scavenging activities from *Loiseleuria procumbens*. *Phytochemistry*, 54 (8), 871-874.
- Cui, D., Yin, Y., Sun, H., Wang, X., Zhuang, J., Wang, L., et. al. (2022). Regulation of cellular redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* seedling by atmospheric pressure cold plasma-generated reactive oxygen/nitrogen species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 240, 113703.
- Cui, D., Zhao, J., Jing, Y., Fan, M., Liu, J., Wang, Z., et. al. (2013). The *Arabidopsis* IDD14, IDD15, and IDD16 cooperatively regulate lateral organ morphogenesis and gravitropism by promoting auxin biosynthesis and transport. *PLoS Genetics*, 9 (9), e1003759.
- Cui, X., Wang, Y., Zhen, W. (2010). The effects of phlorizin stress on the protective enzyme and metabolic regulation substances in the root of *M. micromalus*. *Frontiers of Agriculture in China*, 4, 323-27.
- Cullen, M. G., Thompson, L. J., Carolan, J. C., Stout, J. C., Stanley, D. A. (2019). Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. *PLoS One*, 14 (12), e0225743.
- Curir, P., VanSumere, C. F., Termini, A., Barthe, P., Marchesini, A., Dolci, M. (1990). Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiology*, 92 (4), 1148-1153.
- Dao, T. T., Sehgal, P., Tung, T. T., Møller, J. V., Nielsen, J., Palmgren, M., et. al. (2016). Demethoxycurcumin is a potent inhibitor of P-type ATPases from diverse kingdoms of life. *PLoS One*, 11 (9), e0163260.
- Dastidar, M. G., Jouannet, V., Maizel, A. (2012). Root branching: mechanisms, robustness and plasticity. *WIREs Developmental Biology*, 1, 329–343.
- Dayan, F. E., Duke, S. O., Sauldubois, A., Singh, N., McCurdy, C., Cantrell, C. L. (2007). p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is the herbicidal target site for-triketones from *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry*, 68, 2004–2014.

- De Klerk, G. J., Van Der Krieken, W., de Jong, J. C. (1999). Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 35, 189-199.
- De Koninck, L. (1835). Ueber das phloridzin (phlorrhizin). *Annalen der Pharmacie*, 15 (1), 75-77.
- De La Rosa, A. B., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., et. al. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, 49 (1), 117-121.
- De Oliveira, M. R. (2016). Phloretin-induced cytoprotective effects on mammalian cells: A mechanistic view and future directions. *Biofactors*, 42 (1), 13-40.
- De Reuille, P. B., Bohn-Courseau, I., Ljung, K., Morin, H., Carraro, N., Godin, C., et. al. (2006). Computer simulations reveal properties of the cell–cell signaling network at the shoot apex in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (5), 1627–1632.
- de Wit, M., Keuskamp, D. H., Bongers, F. J., Hornitschek, P., Gommers, C. M., Reinen, E., et. al. (2016). Integration of phytochrome and cryptochrome signals determines plant growth during competition for light. *Current Biology*, 26 (24), 3320-3326.
- Del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 66 (10), 2827-2837.
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., Pozhvanov, G. A., Sokolik, A., Yurin, V. (2014). Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*, 65 (5), 1259-1270.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. (2002). Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, 13, 298 (5601), 2149-53.
- Díaz-Tielas, C., Graña, E., Maffei, M. E., Reigosa, M. J., Sánchez-Moreiras, A. M. (2017). Plasma membrane depolarization precedes photosynthesis damage and long-term leaf bleaching in (E)-chalcone-treated *Arabidopsis* shoots. *Journal of Plant Physiology*, 218, 56-65.
- Díaz-Tielas, C., Graña, E., Reigosa, M. J., Sánchez-Moreiras, A. M. (2016). Biological activities and novel applications of chalcones. *Planta Daninha*, 34, 607-616.
- Díaz-Tielas, C., Graña, E., Sánchez-Moreiras, A. M., Reigosa, M. J., Vaughn, J. N., Pan, Z., et. al. (2019). Transcriptome responses to the natural phytotoxin t-chalcone in *Arabidopsis thaliana* L. *Pest Management Science*, 75 (9), 2490-2504.
- Díaz-Tielas, C., Graña, E., Sotelo, T., Reigosa, M. J., Sánchez-Moreiras, A. M. (2012). The natural compound trans-chalcone induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant, Cell and Environment*, 35 (8), 1500-1517.
- Díaz-Tielas, C., Sotelo, T., Graña, E., Reigosa, M. J., Sánchez-Moreiras, A. M. (2014). Phytotoxic potential of trans-chalcone on crop plants and model species. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33 (2), 181-194.

- Ding, J. U., Sun, Y., Xiao, C. L., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q. (2007). Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. *Journal of Experimental Botany*, 58 (13), 3765-3773.
- Ditengou, F. A., Teale, W. D., Kochersperger, P., Flittner, K. A., Kneuper, I., van der Graaff, E., et. al. (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (48), 18818-23.
- Dogra, V., Rochaix, J. D., Kim, C. (2018). Singlet oxygen-triggered chloroplast-to-nucleus retrograde signalling pathways: an emerging perspective. *Plant, Cell and Environment*, 41(8), 1727-1738.
- Dong, H., Ning, Z., Yu, L., Li, L., Lin, L., Huang, J. (2007). Preparative separation and identification of the flavonoid phlorhizin from the crude extract of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. *Molecules*, 12 (3), 552-562.
- Đorđić, M., Janošević, D., Smailagić, D., Banjac, N., Ninković, S., Stanišić, M., et. al. (2024). Effects of phloretin on seedling growth and histochemical distribution of phenols, polysaccharides and lipids in *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. *Plants*, 13, 1890.
- Doshi, R., McGrath, A. P., Piñeros, M., Szewczyk, P., Garza, D. M., Kochian, L. V., et. al. (2017). Functional characterization and discovery of modulators of SbMATE, the agronomically important aluminium tolerance transporter from *Sorghum bicolor*. *Scientific Reports*, 7, 1–16.
- Dragišić Maksimović, J. J., Živanović, B. D. (2012). Quantification of the antioxidant activity in salt-stressed tissues. In: Shabala, S., Cuin, T. (eds.) *Plant salt tolerance*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 237-250.
- Dugé de Bernoville, T., Gaucher, M., Guyot, S., Durel, C. E., Dat, J. F., Brisset, M. N. (2011). The constitutive phenolic composition of two *Malus × domestica* genotypes is not responsible for their contrasted susceptibilities to fire blight. *Environmental and Experimental Botany*, 74, 65–73.
- Dziągwa-Becker, M. D., Oleszek, M., Ukalska-Jaruga, A., Kucharski, M., Kozłowska, W., Nowak, B., et. al. (2024a). Evaluation of pinocembrin dihydrochalcone properties for potential use as a biopesticide. Preprint.
- Dziągwa-Becker, M., Oleszek, M., Zielińska, S., Oleszek, W. (2024b). Chalcones – Features, identification techniques, attributes, and application in agriculture. *Molecules*, 29, 2247.
- Erdei, L., Szabó-Nagy, A., Laszlavik, M. (1994). Effects of tannin and phenolics on the H⁺-ATPase activity in plant plasma membrane. *Journal of Plant Physiology*, 144 (1), 49-52.
- Eyer, L., Vain, T., Pařízková, B., Oklestkova, J., Barbez, E., Kozubíková, H., et. al. (2016). 2, 4-D and IAA amino acid conjugates show distinct metabolism in *Arabidopsis*. *PloS One*, 11 (7), e0159269.
- Faerman, B., Chalifoux, O., Michalak, M., Agellon, L. B., Mailloux, R. J. (2025). The polyphenols phloretin and quercetin are potent horseradish peroxidase (HRP) inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1869 (9), 130833.
- Fageria, N. K., Moreira, A. (2011). The role of mineral nutrition on root growth of crop plants. *Advances in Agronomy*, 110, 251-331.

- Fahrenholz, S. R., Doleiden, F. H., Tozzolo, A. M., Lamola, A. A. (1974). On the quenching of singlet oxygen by α -tocopherol. *Photochemistry and Photobiology*, 20, 505–9.
- Falhof, J., Pedersen, J. T., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. (2016). Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Molecular Plant*, 9 (3), 323-337.
- Farina, W. M., Balbuena, M. S., Herbert, L. T., Mengoni Goñalons, C., Vázquez, D. E. (2019). Effects of the herbicide glyphosate on honey bee sensory and cognitive abilities: Individual impairments with implications for the hive. *Insects*, 10 (10), 354.
- Feng, Y., Bayaer, E., Qi, Y. (2022). Advances in the Biological Functions of Auxin Transporters in Rice. *Agriculture*, 12, 989.
- Fenwick, G. R., Lutonski, J., Nieman, C. (1990). Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L.—Composition, uses and analysis. *Food Chemistry*, 38 (2), 119-143.
- Fernández de Simón, B., Pérez-Ilzarbe, J., Hernández, T., Gómez-Cordovés, C., Estrella, I. (1992). Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1531-5.
- Filin, A. N., Ivanov, V. B. (2016). Effect of 2, 4-D on cell proliferation and elongation in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63 (1), 166-171.
- Finch-Savage, W. E., Footitt, S. (2017). Seed dormancy cycling and the regulation of dormancy mechanisms to time germination in variable field environments. *Journal of Experimental Botany*, 68, 843–856.
- Flexas, J., Clemente-Moreno, M. J., Bota, J., Brodribb, T. J., Gago, J., Mizokami, Y., et. al. (2021). Cell wall thickness and composition are involved in photosynthetic limitation. *Journal of Experimental Botany*, 72 (11), 3971-3986.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 28 (8), 1056-1071.
- Fracheboud Y., Jompuk C., Ribaut J. M., Stamp P., Leipner J. (2004). Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize. *Plant Molecular Biology*, 56, 241-253.
- Francisco, R. M., Regalado, A., Ageorges, A., Burla, B. J., Bassin, B., Eisenach, C., et. al. (2013). ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-glucosides. *Plant Cell*, 25, 1840–1854.
- Frank, A., Sirola, E., Kroutil, W., Grogan, G. (2014). Mutational analysis of the C–C bond cleaving enzyme phloretin hydrolase from *Eubacterium ramulus*. *Topics in Catalysis*, 57 (5), 376-384.
- Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 58, 62–97.
- Friml, J. (2003). Auxin transport—shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology*, 6 (1), 7-12.
- Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., et al. (2002). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, 108, 661–673.

- Friml, J., Justyna, W., Eva, B., Kurt, M., Klaus, P. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, 415, 806–809.
- Frugoli, J. A., Zhong, H. H., Nuccio, M. L., McCourt, P., McPeck, M. A., Thomas, T. L., et. al. (1996). Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology*, 112 (1), 327-336.
- Fry, D. M. (1995). Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 103 (suppl 7), 165-171.
- Fu, L., Liu, Y., Qin, G., Wu, P., Zi, H., Xu, Z., et. al. (2021). The TOR–EIN2 axis mediates nuclear signalling to modulate plant growth. *Nature*, 591 (7849), 288-292.
- Fu, Y., Ma, L., Li, J., Hou, D., Zeng, B., Zhang, L., et. al. (2024). Factors Influencing Seed Dormancy and Germination and Advances in Seed Priming Technology. *Plants*, 13 (10), 1319.
- Fukaki, H., Okushima, Y., Tasaka, M. (2007). Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *International Review of Cytology*, 256, 111-137.
- Fukaki, H., Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*, 69, 437-449.
- Fulcher, A. F., Ranney, T. G., Burton, J. D., Walgenbach, J. F., Danehower, D. A. (1998). Role of foliar phenolics in host plant resistance of *Malus* taxa to adult Japanese beetles. *HortScience* 33 (5), 862-865.
- Funari, C. S., Passalacqua, T. G., Rinaldo, D., Napolitano, A., Festa, M., Capasso, A., et. al. (2011). Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanol extracts. *Phytochemistry*, 72 (16), 2052-2061.
- Funck, D., Eckard, S., Müller, G. (2010). Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 10 (1), 70.
- Galindo, J. C. G., Hernandez, A., Dayan, F. E., Tellez, M. R., Macias, F. A., Paul, R. N., et. al. (1999). Dehydrozalanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. *Phytochemistry*, 52, 805-813.
- Gallavotti, A., Yang, Y., Schmidt, R. J., Jackson, D. (2008). The relationship between auxin transport and maize branching. *Plant Physiology*, 147, 1913–1923.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., et al. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 282, 2226–2230.
- Garabrant, D. H., Philbert, M. A. (2002). Review of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) epidemiology and toxicology. *Critical Reviews in Toxicology*, 32 (4), 233-257.
- Garay-Arroyo, A., De La Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Azpeitia, E., Álvarez-Buylla, E. R. (2012). Hormone symphony during root growth and development. *Developmental Dynamics*, 241 (12), 1867-1885.

- García-Angulo, P., Alonso-Simón, A., Mélida, H., Encina, A., Acebes, J. L., Álvarez, J. M. (2009). High peroxidase activity and stable changes in the cell wall are related to dichlobenil tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1229–1240.
- Gaucher, M., de Bernonville, T. D., Lohou, D., Guyot, S., Guillemette, T., Brisset, M. N., et. al. (2013). Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: Insight into the role of apple major flavonoids. *Phytochemistry*, 90, 78-89.
- Gazaryan, I. G., Lagrimini, L. M., Ashby, G. A., Thorneley, R. N. (1996). Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochemical Journal*, 313 (3), 841-847.
- Geisler, M., Aryal, B., Di Donato, M., Hao, P. (2017). A critical view on ABC transporters and their interacting partners in auxin transport. *Plant and Cell Physiology*, 58, 1601–1614.
- Geisler, M., Blakeslee, J. J., Bouchard, R., Lee, O. R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., et al. (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant Journal*, 44, 179–194.
- Geiss, G., Gutierrez, L., Bellini, C. (2009). Adventitious root formation: new insights and perspectives. *Annual Plant Reviews*, 37, 127-156.
- Ghani, M. U., Yuan, H., Tian, M., Kamran, M., Hou, F. (2023). Aqueous litter extracts of native grass species suppress exotic plant species under allelopathic conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42 (3), 1665-1680.
- Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 6697-6703.
- Giannasi, D. E. (1972). *The Flavonoid Systematics of the Genus Dahlia (Compositae)*. The University of Iowa, Iowa City, IA, USA.
- Gilbert, L. I. (2004). Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215, 1–10.
- Glass, A. D., Dunlop, J. (1974). Influence of phenolic acids on ion uptake: IV. Depolarization of membrane potentials. *Plant Physiology*, 54 (6), 855-858.
- Glawischnig, E. (2007). Camalexin. *Phytochemistry*, 68, 401–406.
- Gniazdowska, A., Bogatek, R. (2005). Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27 (3), 395-407.
- Gniazdowska, A., Krasuska, U., Andrzejczak, O., Soltys, D. (2015). Allelopathic compounds as oxidative stress agents: yes or no. In: Gupta, K. J., Igamberdiev, A. U. (eds.) *Reactive oxygen and nitrogen species. Signaling and communication in plants*, Springer International Publishing, Switzerland, pp. 155-176.
- Gökmen, V., Acar, J., Kahraman, N. (2003). Influence of conventional clarification and ultrafiltration on the phenolic composition of golden delicious apple juice. *Journal of Food Quality*, 26 (3), 257-266.

- Gomez, C., Terrier, N., Torregrosa, L., Violet, S., Fournier-Level, A., Verries, C., et. al. (2009). Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters. *Plant Physiology*, 150 (1), 402-415.
- González-García, E., Sánchez-Moreiras, A. M., Vieites-Álvarez, Y. (2025). Allelopathic potential and chemical profile of wheat, rice and barley against the herbicide-resistant weeds *Portulaca oleracea* L. and *Lolium rigidum* Gaud. *BMC Plant Biology*, 25 (1), 624.
- Goodman, C. D., Casati, P., Walbot, V. (2004) A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell*, 16, 1812–1826.
- Goto-Yamada, S., Oikawa, K., Bizan, J., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Mano, S., et. al. (2019). Sucrose starvation induces microautophagy in plant root cells. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1604.
- Goyal, D., Yadav, A., Prasad, M., Singh, T. B., Shrivastav, P., Ali, A., et. al. (2020). Effect of heavy metals on plant growth: an overview. *Contaminants in Agriculture: Sources, Impacts and Management*, 79-101.
- Grabov, A., Ashley, M. K., Rigas, S., Hatzopoulos, P., Dolan, L., Vicente-Agullo, F. (2005). Morphometric analysis of root shape. *New Phytologist*, 165, 641–652.
- Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G., Soppe, W. J. (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell and Environment*, 35, 1769–1786.
- Graña, E., Sotelo, T., Díaz-Tielas, C., Araniti, F., Krasuska, U., Bogatek, R., et. al. (2013). Citral induces auxin and ethylene mediated malformations and arrests cell division in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 271–282.
- Grand View Research (2024). *Herbicides Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type (Selective, Non-Selective), By Crop Type (Cereals & Grains, Fruits & Vegetables), By Region, And Segment Forecasts, 2024 – 2030*. San Francisco: Grand View Research Inc. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/herbicides-market>
- Grayson, B. T., Williams, K. S., Freehauf, P. A., Pease, R. R., Ziesel, W. T., Sereno, R. L., et. al. (1987). The physical and chemical properties of the herbicide cinmethylin (SD 95481). *Pesticide Science*, 21, 143–153.
- Greenaway, W., May, J., Whatley, F. R. (1989). Flavonoid aglycones identified by gas chromatography-mass spectrometry in bud exudate of *Populus balsamifera*. *Journal of Chromatography*, 472, 393-400.
- Guerrero-Estévez, S. M., López-López, E. (2016). Effects of endocrine disruptors on reproduction in viviparous teleosts with intraluminal gestation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 26, 563e587.
- Guilfoyle, T., Hagen, G. (2015). *Plant hormone signalling*. Portland Press.
- Gunina, A., Kuzyakov, Y. (2015). Sugars in soil and sweets for microorganisms: review of origin, content, composition and fate. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 87-100.
- Guo P., Li R. (2000). Effects of high nocturnal temperature on photosynthetic organization in rice leaves”. *Acta Botanica Sinica*, 42, 13-18.

- Gupta, V. K., Ali, I., Saini, V. K. (2006). Adsorption of 2, 4-D and carbofuran pesticides using fertilizer and steel industry wastes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299 (2), 556-563.
- Gutbrodt, B., Mody, K., Wittwer, R., Dorn, S. (2011). Within-plant distribution of induced resistance in apple seedlings: rapid acropetal and delayed basipetal responses. *Planta*, 233 (6), 1199-1207.
- Habtemariam, S. (2023). The molecular pharmacology of phloretin: anti-inflammatory mechanisms of action. *Biomedicines*, 11, 143.
- Hagen, G. (2015). Auxin signal transduction. *Essays in Biochemistry*, 58, 1-12.
- Hagner, M., Penttinen, O. P., Tiilikkala, K., Setälä, H. (2013). The effects of biochar, wood vinegar and plants on glyphosate leaching and degradation. *European Journal of Soil Biology*, 58, 1-7.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E. M., Kuć, J. (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, 20 (1), 73-82.
- Han, C., Mei, Y., Kuchkarova, N., Toshmatov, Z., Fang, S., Shao, H. (2024a). Allelopathic and phytotoxic activity of essential oil of *Elaeagnus angustifolia* flowers and its major constituents on *Amaranthus retroflexus* and *Lolium perenne*. *Natural Product Research*, 1–10.
- Han, J. T., Zhang, S. P., Jia, W. J., Zhang, Z., Wang, Y., He, Y. X. (2019). Discovery and structural analysis of a phloretin hydrolase from the opportunistic human pathogen *Mycobacterium abscessus*. *The FEBS Journal*, 286 (10), 1959-1971.
- Han, L., Fang, C., Zhu, R., Peng, Q., Li, D., Wang, M. (2017). Inhibitory effect of phloretin on α -glucosidase: Kinetics, interaction mechanism and molecular docking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 520-527.
- Han, Y., Qiu, Z., Ji, S., Zhao, G. R. (2024b). Construction and optimization of engineered *Saccharomyces cerevisiae* for de novo synthesis of phloretin and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73 (1), 735-746.
- Hanzawa, T., Shibasaki, K., Numata, T., Kawamura, Y., Gaude, T., Rahman, A. (2013). Cellular auxin homeostasis under high temperature is regulated through a SORTING NEXIN1-dependent endosomal trafficking pathway. *The Plant Cell*, 25 (9), 3424-3433.
- Harborne, J.B. (1966). Comparative biochemistry of the flavonoids-I. Distribution of chalcone and alurone pigments in plants. *Phytochemistry*, 5, 111–115.
- Hare, P. D., Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21, 79–102.
- Hare, P. D., Cress, W. A., Van Staden, J. (2003). A regulatory role for proline metabolism in stimulating *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Plant Growth Regulation*, 39 (1), 41-50.
- Hayashi, K. I., Arai, K., Aoi, Y., Tanaka, Y., Hira, H., Guo, R., et. al. (2021). The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications*, 12, 6752.
- Heath, R. L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125 (1), 189-198.

- Hedrich, R. (2012). Ion channels in plants. *Physiological Reviews.*, 92 (4), 1777-1811.
- Heisey, R. M. (1999). Development of an allelopathic compound from tree of heaven (*Ailanthus altissima*) as a natural product herbicide. In: Cutler, H., Cutler, S. (eds.) *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*. CRC Press, Boca Raton, pp. 57-68.
- Hejl, A. M., Koster, K. L. (2004a). Juglone disrupts root plasma membrane H⁺-ATPase activity and impairs water uptake, root respiration, and growth in soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*). *Journal of Chemical Ecology*, 30 (2), 453-471.
- Hejl, A. M., Koster, K. L. (2004b). The allelochemical sorgoleone inhibits root H⁺-ATPase and water uptake. *Journal of Chemical Ecology*, 30 (11), 2181-2191.
- Hillar, A., Nicholls, P. (1992). A mechanism for NADPH inhibition of catalase compound II formation. *FEBS Letters*, 314, 179-182.
- Hilt, P., Schieber, A., Yildirim, C., Arnold, G., Klaiber, I., Conrad, J., et. al. (2003). Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2896–1781 9.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42 (5), 462-468.
- Hirota, T., Izumi, M., Wada, S., Makino, A., Ishida, H. (2018). Vacuolar protein degradation via autophagy provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 59 (7), 1363-1376.
- Hoang Anh, L., Van Quan, N., Tuan Nghia L., Dang Xuan, T. (2021). Phenolic allelochemicals: Achievements, limitations, and prospective approaches in weed management. *Weed Biology and Management*, 21, 37-67.
- Hoffman D. J. (1990). Embryotoxicity and teratogenicity of environmental contaminants to bird eggs. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 115, 39-89.
- Hofmann, A., Wittenmayer, L., Arnold, G., Schieber, A., Merbach W. (2009). Root exudation of phloridzin by apple seedlings (*Malus x domestica* Borkh.) with symptoms of apple replant disease. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 82, 193-198.
- Holm, F. A., Johnson, E. N. (2009). The history of herbicide use for weed management on the prairies. *Prairie Soils and Crops Journal*, 2, 1-10.
- HRACglobal (2024) <https://hracglobal.com/tools/2024-hrac-global-herbicide-moa-classification>
- <https://bioweed.com.au/bioweed-organic-home/> Bioweed (21.01.2026)
- <https://european-union.europa.eu> (14.8.2025). Farm to Fork Strategy
- <https://www.epa.gov/> (24.8.2025) U.S Environmental Protection Agency (EPA)
- <https://www.fao.org/> **FAO (2024)** Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). World Agrochemical Market Report 2024: Herbicides Segment Analysis. Rome: FAO.
- <https://www.fao.org/> **FAO (2025)** Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Agrochemical Market Report 2025: Herbicides Segment Analysis. Rome: FAO.

<https://www.lorenz-baumarkt.de/garten-freizeit/duengen-erden-mulche/erden-rindenmulch/5378/floragard-blumenerde-10-l>

<https://www.rcsb.org/> Protein Data Bank (12.05.2024).

Hu, X., Zhou, Z., Han, L., Li, S., Zhou, W. (2020). Preparation and characterization of phloretin by complexation with cyclodextrins. *New Journal of Chemistry*, 44 (14), 5218-5223.

Hu, Z., Zhao, C., Li, Q., Feng, Y., Zhang, X., Lu, Y., et. al. (2023). Heavy metals can affect plant morphology and limit plant growth and photosynthesis processes. *Agronomy*, 13 (10), 2601.

Huang, L., Yu, L. J., Zhang, X., Fan, B., Wang, F. Z., Dai, Y. S., et. al. (2019). Autophagy regulates glucose-mediated root meristem activity by modulating ROS production in *Arabidopsis*. *Autophagy*, 15 (3), 407-422.

Hunter, M. D., Hull, L. A. (1993). Variation in concentrations of phloridzin and phloretin in apple foliage. *Phytochemistry*, 34 (5), 1251-1254.

Hvattum, E. (2002). Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 655–1784 62.

Hynes, R. K., Boyetchko, S. M. (2006). Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 38 (4), 845-849.

Ibdah, M., Martens, S., Gang, D. R. (2017). Biosynthetic pathway and metabolic engineering of plant dihydrochalcones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (10), 2273-2280.

Ilić, N., Magnus, V., Östin, A., Sandberg, G. (1997). Stable-isotope labeled metabolites of the phytohormone, indole-3-acetic acid. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 39 (5), 433-440.

IMARC Group (2023). Global Herbicides Market: Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2023 – 2028. IMARC Services Pvt. Ltd. <https://www.imarcgroup.com/herbicides-market>

Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Moriyasu, Y. (2006). AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in *Arabidopsis* root tip cells. *Plant and Cell Physiology*, 47 (12), 1641-1652.

Iqbal, S., Tahir, S., Dass, A., Bhat, M. A., Rashid, Z. (2020). Bio-efficacy of pre-emergent herbicides for weed control in maize: a review on weed dynamics evaluation. *Journal of Experimental Agriculture International*, 42 (8), 13-23.

Isa, N. M., Abdelwahab, S. I., Mohan, S., Abdul, A. B., Sukari, M. A., Taha, M. M. E., et al. (2012). *In vitro* anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of boesenbergin A, a chalcone isolated from *Boesenbergia rotunda* (L.) (fingerroot). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45, 524–530.

Islam, A. M., Karim, S. M. R., Kheya, S. A., Yeasmin, S. (2024). Unlocking the potential of bioherbicides for sustainable and environment friendly weed management. *Heliyon*, 10 (16).

- Ito, H., Ohtsuka, T., Tanaka, A. (1996). Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a via 7-hydroxymethyl chlorophyll. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1475-1479.
- Ivanchenko, M. G., Muday, G. K., Dubrovsky, J. G. (2008). Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 55, 335–347.
- Iwamoto, M., Higo, H., Higo, K. (2000). Differential diurnal expression of rice catalase genes: the 5'-flanking region of CatA is not sufficient for circadian control. *Plant Science*, 151 (1), 39-46.
- Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113, 287.
- Janse van Rensburg, H. C., Van den Ende, W., Signorelli, S. (2019). Autophagy in plants: both a puppet and a puppet master of sugars. *Frontiers in Plant Science*, 10, 14.
- Jansen, M. A., van den Noort, R. E., Tan, M. A., Prinsen, E., Lagrimini, L. M., Thorneley, R. N. (2001). Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiology*, 126 (3), 1012-1023.
- Jiang, W., Chen, R., Zhao, L., Duan, Y., Wang, H., Yan, Z., et. al. (2023). Isolation of phloridzin-degrading, IAA-producing bacterium *Ochrobactrum haematophilum* and its effects on the apple replant soil environment. *Horticultural Plant Journal*, 9, 199-208.
- Jianghong, Z., Zhiquan, M., Liqin, W. (2007). Effect of phloridzin on physiological characteristics of *Malus hupehensis* Rehd. Seedlings. *Scientia Agricultura Sinica*, 40, 492–498.
- Jinshui, C., Qun, X., Lina, L., Rohrer, J. (2008). Determination of phenolic compounds in apple orchard soil. *Thermo Fisher Scientific*, 88, 1-4.
- Jones, P., Vogt, T. (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, 213 (2), 164-174.
- Jönsson, A. (1961). Chemical structure and growth activity of auxins and antiauxins. *Encyclopedia of Plant Physiology*, 14, 959-1006.
- Jonsson, H., Heisler, M. G., Shapiro, B. E., Meyerowitz, E. M., Mjolsness, E. (2006). An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 1633–1638.
- Josue, J. S., Frank, H. A. (2002). Direct determination of the S1 excited-state energies of xanthophylls by low-temperature fluorescence spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A*, 106 (19), 4815-4824.
- Kacprzyk, J., Brogan, N. P., Daly, C. T., Doyle, S. M., Diamond, M., Molony, E. M., et. al. (2017). The retraction of the protoplast during PCD is an active, and interruptible, calcium-flux driven process. *Plant Science*, 260, 50-59.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology*, 91, 29-66.

- Kangasjärvi, S., Lepistö, A., Hännikäinen, K., Piippo, M., Luomala, E. M., Aro, E. M., et. al. (2008). Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochemical Journal*, 412 (2), 275-285.
- Kannan, N. D., Kulandaivelu, G. (2011). Drought induced changes in physiological, biochemical and phytochemical properties of *Withania somnifera* Dun. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (16), 3929-3935.
- Karabulut, S., Toprak, M. (2020). Biophysical study of phloretin with human serum albumin in liposomes using spectroscopic methods. *European Biophysics Journal*, 49 (6), 463-472.
- Karakus, Y. Y. (2020). Typical catalases: function and glutathione system and oxidative stress in health and disease. In: Bagatini, M., Assmann, C., Blumenberg, M. (eds.). *Glutathione system and oxidative stress in health and disease*. BoD–Books on Demand. pp. 111.
- Kariola, T., Brader, G., Li, J., Palva, E. T. (2005). Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *Plant Cell*, 17 (1), 282-294.
- Kasahara H. (2016). Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80 (1), 34-42.
- Kato, S., Ueno, T., Fukuzumi, S., Watanabe, Y. (2004). Catalase reaction by myoglobin mutants and native catalase: mechanistic investigation by kinetic isotope effect. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (50), 52376-52381.
- Kaur, G., Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K. (2013). Lead (Pb)-induced biochemical and ultrastructural changes in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Protoplasma*, 250, 53–62.
- Keller, C. P., Barkosky, R. R., Seil, J. E., Mazurek, S. A., Grundstad, M. L. (2008). The electrical response of *Phaseolus vulgaris* roots to abrupt exposure to hydroquinone. *Plant Signaling and Behavior*, 3 (9), 633-640.
- Khaleghi, E., Arzani, K., Moallemi, N., Barzegar, M. (2012). Evaluation of chlorophyll content and chlorophyll fluorescence parameters and relationships between chlorophyll a, b and chlorophyll content index under water stress in *Olea europaea* cv. Dezful. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 6 (8), 636-639.
- Khan, M. S. I., Kato-Noguchi, H. (2016). Assessment of allelopathic potential of '*Couroupita guianensis*' Aubl. *Plant Omics*, 9 (2), 115-120.
- Kirkman, H. N., Gaetani, G. F. (1984). Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 4343-4347.
- Kirkman, H. N., Gaetani, G. F. (2007). Mammalian catalase: venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 44-50.
- Kirkman, H. N., Galiano, S., Gaetani, G. F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 660-666.
- Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., Gaetani, G. F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH. *J. Biol. Chem.* 274, 13908-13914.

- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., Takabayashi, J. (2006). Analysis of defensive responses activated by volatile Allo-ocimene treatment in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 67, 1520–1529.
- Kiss, J. Z., Hertel, R., Sack, F. D. (1989). Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 177, 198–206.
- Kitamura, S. (2006). Transport of flavonoids: from cytosolic synthesis to vacuolar accumulation. In: Grotewold, E. (ed.) *Science of flavonoids*. Springer, Berlin, Germany, pp. 123–146.
- Kjeldsen, P., Barlaz, A. M., Rooker, P. A., Baun, A., Ledin, A., Christensen, H. T. (2002). Present and long-term composition of MSW landfill leachate: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 32 (4), 297-336.
- Klaic, R., Kuhn, R. C., Foletto, E. L., Dal Prá, V., Jacques, R. J., Guedes, J. V., et. al. (2015). An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments*, 183-199.
- Klein, M., Burla, B., Martinoia, E. (2006). The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Letters*, 580, 1112–1122.
- Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A. R., Tasaka, M., Morita, M. T., Friml, J. (2010). Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 22344–22349.
- Klingauf, F. (1971). Die wirkung des glucosids phlorizin auf das wirtswhalverhalten von *Rhopalosiphum insertum* und *Aphis pomi* de geer (Homoptera: Aphididae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 68, 41–55.
- Knudsen, C. G., Lee, D. L., Michaely, W. J., Chin, H. L., Nguyen, N. H., Rusay, R. J., et al. (2000). Discovery of the triketone class of HPPD inhibiting herbicides and their relationship to naturally occurringtriketones. In: Narwal, S. S., Hoagland, R. E., Dilday, R. H., Reigosa, M. J. (eds.) *Allelopathy in ecological agriculture and forestry*. Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 101–111.
- Ko, T. P., Safo, M. K., Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Wang, C., Wu, S. H., et. al. (2000). Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallographica Section D*, 56, 241-245.
- Kono, Y., Takahashi, M., Mihara, M., Matsushita, K., Nishina, M., Kameda, Y. (1997). Effect of a trehalase inhibitor, validoxylamine A, on oocyte development and ootheca formation in *Periplaneta americana* (Blattodea, Blattidae). *Applied Entomology and Zoology*, 32 (2), 293-301.
- Konstantinović, B. (1999). *Poznavanje i suzbijanje korova*, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Koohshekan, B., Divsalar, A., Saiedifar, M., Saboury, A. A., Ghalandari, B., Gholamian, A., et. al. (2016). Protective effects of aspirin on the function of bovine liver catalase: A spectroscopy and molecular docking study. *Journal of Molecular Liquids*, 218, 8-15.
- Kowalczyk, M., Sandberg, G. (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127 (4), 1845-1853.

- Krähmer, H., Walter, H., Jeschke, P., Haaf, K., Baur, P., Evans, R. (2021). What makes a molecule a pre-or a post-herbicide—how valuable are physicochemical parameters for their design? *Pest Management Science*, 77 (11), 4863–4873.
- Krasensky, J., Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63, 1593–1608.
- Krizek, B. A. (2011). Auxin regulation of *Arabidopsis* flower development involves members of the AINTEGUMENTA-LIKE/PLETHORA (AIL/PLT) family. *Journal of Experimental Botany*, 62 (10), 3311–3319.
- Kuderoová, A., Urbánková, I., Válková, M., Malbeck, J., Brzobohaty, B., Némethová, D., et. al. (2008). Effects of conditional IPT dependent cytokinin overproduction on root architecture of *Arabidopsis* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 49, 570–582.
- Kukavica, B., Mojović, M., Vucčinić, Ž., Maksimović, V., Takahama, U., Jovanović, S. V. (2009). Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant and Cell Physiology*, 50 (2), 304–317.
- Kumar, P. (2025). Role of glutathione in heavy metal detoxification. In: Kumar, P., and Gogia, N. (eds.). *Heavy metal toxicity and neurodegeneration*. Academic Press, pp. 203–224.
- Kupidłowska, E., Dobrzyńska, K., Parys, E., Zobel, A. M. (1994). Effect of coumarin and xantoxin on mitochondrial structure, oxygen uptake and succinate dehydrogenase activity in onion root cells. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 2471–2480.
- Ladhari, A., Romanucci, V., De Marco, A., De Tommaso, G., Di Marino, C., Di Fabio, G., et. al. (2018). Herbicidal potential of phenolic and cyanogenic glycoside compounds isolated from Mediterranean plants. *Ecological Questions*, 29 (3), 25–34.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Simoniello, M. F., Poletta, G. L., Junges, C. M., Peltzer, P. M., et. al. (2015). Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2,4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air and Soil Pollution*, 226.
- Lal, R., Dogra, C., Malhotra, S., Sharma, P., Pal, R. (2006). Diversity, distribution and divergence of lin genes in hexachlorocyclohexane-degrading sphingomonads. *Trends in Biotechnology*, 24, 121–130.
- Lamb, C., Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 48 (1), 251–275.
- Land, H., Humble, M. S. (2018). YASARA: a tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. *Protein Engineering: Methods and Protocols*, 43–67.
- Landi, M., Misra, B. B., Muto, A., Bruno, L., Araniti, F. (2020). Phytotoxicity, morphological, and metabolic effects of the sesquiterpenoid nerolidol on *Arabidopsis thaliana* seedling roots. *Plants*, 9 (10), 1347.
- Lane, T. S., Rempe, C. S., Davitt, J., Staton, M. E., Peng, Y., Soltis, D. E., et. al. (2016). Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology. *BMC Biotechnology*, 16, 1–10.

- Langi, P., Kiokias, S., Varzakas, T., Proestos, C. (2018). Carotenoids: From plants to food and feed industries. In: Barreiro, C., Barredo, J. L. (eds.) Microbial carotenoids: Methods and protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, pp. 57-71.
- Laplaze, L., Benková, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., et. al. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell*, 19, 3889–3900.
- Laskowski, M. J., Williams, M. E., Nusbaum, H. C., Sussex, I. M. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, 121, 3303–3310.
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., et. al. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science*, 18 (8), 450-458.
- Le Clere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuda, S. P., Bartel, B. (2002). Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (23), 20446-20452.
- Lee, S. W., Lee, G., Jo, J. H., Yang, Y., Ahn, J. H. (2024). Biosynthesis of phloretin and its C-glycosides through stepwise culture of *Escherichia coli*. *Applied Biological Chemistry*, 67(1), 99.
- Lehman, M. E., Blum, U. (1999). Influence of pretreatment stresses on inhibitory effects of ferulic acid, an allelopathic phenolic acid. *Journal of Chemical Ecology*, 25 (7), 1517-1529.
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D. (2010). Proline metabolism and transport in plant development. *Amino acids*, 39 (4), 949-962.
- Leu, S. J., Lin, Y. P., Lin, R. D., Wen, C. L., Cheng, K. T., Hsu, F. L., et. al. (2006). Phenolic constituents of *Malus doumeri* var. *formosana* in the field of skin care. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (4), 740-745.
- Lewis, D. R., Miller, N. D., Splitt, B. L., Wu, G., Spalding, E. P. (2007). Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* Multidrug Resistance-Like ABC transporter genes. *Plant Cell*, 19, 1838–1850.
- Li, F., Vierstra, R. D. (2012). Autophagy: A multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in Plant Science*, 17, 526–537.
- Li, J., Xu, H. H., Liu, W. C., Zhang, X. W., Lu, Y. T. (2015). Ethylene inhibits root elongation during alkaline stress through AUXIN1 and associated changes in auxin accumulation. *Plant Physiology*, 168, 1777–1791.
- Li, P., Ding, L., Zhang, L., He, J., Huan, Z. (2019). Weisiensin B inhibits primary and lateral root development by interfering with polar auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 738–745.
- Li, Q., Wang, S., Wang, J., Chen, L., Liu, W., Li, Z., et. al. (2024). Mechanism of phloretin accumulation in *Malus hupehensis* grown at high altitudes: evidence from quantitative 4D proteomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72 (35), 19526-19536.
- Li, X., Cai, W., Liu, Y., Li, H., Fu, L., Liu, Z. et al. (2017). Differential TOR activation and cell proliferation in *Arabidopsis* root and shoot apices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (10), 2765–2770.

- Li, X., Chen, B., Xie, H., He, Y., Zhong, D., Chen, D. (2018). Antioxidant structure–activity relationship analysis of five dihydrochalcones. *Molecules*, 23 (5), 1162.
- Li, X., Mo, X., Shou, H., Wu, P. (2006). Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 47, 1112–1123.
- Li, Y., Sun, Z., Zhuang, X., Xu, L., Chen, S., Mingzhi, L. (2003). Research progress on microbial herbicides. *Crop Protection*, 22, 247–252.
- Li, Y., Wang, X., Yang, X., Wu, X., Wang, Z., Zhao, Y., et. al. (2022). Effect of the odour compound from *Periploca sepium* Bunge on the physiological and biochemical indices, photosynthesis and ultrastructure of the leaves of *Humulus scandens* (Lour.) Merr. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 238, 113556.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L., Douce, R. (eds.) *Methods in enzymology*, vol. 148, Academic Press, pp. 350-382.
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1 (1), F4-3.
- Lin, W. H., Wang, Y., Mueller-Roeber, B., Brearley, C. A., Xu, Z. H., Xue, H. W. (2005). At5PTase13 modulates cotyledon vein development through regulating auxin homeostasis. *Plant Physiology*, 139 (4), 1677–1691.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56 (3), 658-666.
- Linsmaier, E. M., Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18, 100–127.
- Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A., Kondracka, K. (2013). Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *International Agrophysics*, 27 (4).
- Liu, P. P., Montgomery, T. A., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Nonogaki, H., Carrington, J. C. (2007). Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal*, 52 (1), 133-146.
- Liu, S., Jia, H., Peng, Y., Li, Z., Xi, W., Yin, F., et. al. (2024). Potential allelopathic effect of *Ipomoea aquatica* to *Microcystis aeruginosa* growth. *Water, Air and Soil Pollution*, 235 (12), 819.
- Liu, X., Liu, J., Lei, D., Zhao, G. R. (2022). Modular metabolic engineering for production of phloretic acid, phloretin and phlorizin in *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 247, 116931.
- Liu, X., Zhang, H., Zhao, Y., Feng, Z., Li, Q., Yang, H. Q., et. al. (2013). Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (38), 15485-15490.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140 (5), 943-950.

- Loomis, D., Guyton, K., Grosse, Y., El Ghissasi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., et. al. (2015). Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncology*, 16, 891e892.
- Lopes, R. W. N., Marques Morais, E., Lacerda, J. J. D. J., Araújo, F. D. D. S. (2022). Bioherbicidal potential of plant species with allelopathic effects on the weed *Bidens bipinnata* L. *Scientific Reports*, 12 (1), 1-12.
- Lu, Y. P., Li, Z. S., Drozdowicz, Y. M., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., Rea, P. A. (1998). AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell*, 10, 267–282.
- Luo, P., Di, D. W. (2023). Precise regulation of the TAA1/TAR-YUCCA auxin biosynthesis pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (10), 8514.
- Lymperopoulos, P., Msanne, J., Rabara, R. (2018). Phytochrome and phytohormones: working in tandem for plant growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1037.
- Mahnkopp, F., Simon, M., Lehdorff, E., Pätzold, S., Wrede, A., Winkelmann, T. (2018). Induction and diagnosis of apple replant disease (ARD): a matter of heterogeneous soil properties? *Scientia Horticulturae*, 241, 167–177.
- Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment*, 28 (1), 67-77.
- Malamy, J. E., Ryan, K. S. (2001). Environmental regulation of lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 127 (3), 899-909.
- Mancini, S. D., Edwards, J. M. (1979). Cytotoxic principles from the sap of *Kalmia latifolia*. *Journal of Natural Products*, 42 (5), 483-488.
- Mano, Y., Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63 (8), 2853-2872.
- Manzoor, M. A., Sabir, I. A., Shah, I. H., Riaz, M. W., Rehman, S., Song, C., et. al. (2023). Flavonoids: a review on biosynthesis and transportation mechanism in plants. *Functional and Integrative Genomics*, 23 (3), 212.
- Mariadoss, A. V., Vinyagam, R., Rajamanickam, V., Sankaran, V., Venkatesan, S., David, E. (2019). Pharmacological aspects and potential use of phloretin: A systemic review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 19 (13), 1060-1067.
- Marques, A. T., Santos, S. P., Rosa, M. G., Rodrigues, M. A., Abreu, I. A., Frazao, C., et. al. (2014). Expression, purification and crystallization of MnSOD from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70 (5), 669-672.
- Masclaux-Daubresse, C., Chen, Q., Havé, M. (2017). Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 8–17.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 525-532.

- May, M. J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M. V., Inze, D. (1998). Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 49 (321), 649–667.
- McClung, C. R. (1997). Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 489–496.
- McRae, D. H., Bonner, J. (1953). Chemical structure and antiauxin activity. *Physiologia Plantarum*, 6 (3).
- Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., et. al. (2012). Rapid and comprehensive evaluation of (poly) phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, 17 (12), 14821-14840.
- Menon, N., Richmond, D., Rahman, M. R., Menon, B. R. (2022). Versatile and facile one-pot biosynthesis for amides and carboxylic acids in *E. coli* by engineering auxin pathways of plant microbiomes. *ACS Catalysis*, 12 (4), 2309-2319.
- Meseldžija, M., Bursić, V., Vuković, G., Petrović, A., Jajić, I., Hadžistević, B. (2014). The effect of present herbicides and their metabolites in canal water on biological parameters *Lemna minor* L. *Acta Herbologica*, 23 (1), 77-86.
- Mesnage, R., Székács, A., Zaller, J. G. (2021). Herbicides: Brief history, agricultural use, and potential alternatives for weed control. In: Mesnage, R. Zaller, J. G. (eds.) *Herbicides* Elsevier, pp. 1-20.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61 (15), 4197-4220.
- Michaelis, L., Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333.
- Michniewicz, M., Brewer, P. B., Friml, J. (2007). Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *Arabidopsis Book*, 5, e0108–e0128.
- Migliaccio, F., Tassone, P., Fortunati, A. (2013). Circumnutation as an autonomous root movement in plants. *American Journal of Botany*, 100 (1), 4-13.
- Mikulic Petkovšek, M., Stampar, F., Veberic, R. (2009). Seasonal changes in phenolic compounds in the leaves of scab-resistant and susceptible apple cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, 89, 745-753.
- Mishra, B. S., Sharma, M., Laxmi, A. (2022). Role of sugar and auxin crosstalk in plant growth and development. *Physiologia Plantarum*, 174 (1), e13546.
- Mishra, N., Jiang, C., Chen, L., Paul, A., Chatterjee, A., Shen, G. (2023). Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1110622.

- Mishra, P., Dixit, A., Ray, M., Sabat, S. C. (2014). Mechanistic study of CuZn-SOD from *Ipomoea carnea* mutated at dimer interface: enhancement of peroxidase activity upon monomerization. *Biochimie*, 97, 181-193.
- Mishra, P., Sharma, P. (2019). Superoxide Dismutases (SODs) and their role in regulating abiotic stress induced oxidative stress in plants. In: Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V., Nahar, K., Fujita, M. (eds.) *Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: production, metabolism, signaling and defense mechanisms*. John Wiley and Sons Ltd., Newark, pp 53-88.
- Mitchell, M. J., Keogh, D. P., Crooks, J. R., Smith, S. L. (1993). Effects of plant flavonoids and other allelochemicals on insect cytochrome P-450 dependent steroid hydroxylase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23 (1), 65-71.
- Mitić, N., Stanišić, M., Savić, J., Ćosić, T., Stanisavljević, N., Miljuš-Đukić, J., et. al. (2018). Physiological and cell ultrastructure disturbances in wheat seedlings generated by *Chenopodium murale* hairy root exudate. *Protoplasma*. 255 (6), 1683-1692.
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23 (10), 663-679.
- Mockaitis, K., Estelle, M. (2008). Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, 55-80.
- Mohanty, S., Grimm, B., Tripathy, B. C. (2006). Light and dark modulation of chlorophyll biosynthetic genes in response to temperature. *Planta*, 224, 692-699.
- Mondola, P., Damiano, S., Sasso, A., Santillo, M. (2016). The Cu, Zn superoxide dismutase: not only a dismutase enzyme. *Frontiers in Physiology*, 7, 594.
- Motamedi, M., Karimmojeni, H., Sini, F. G., Majidi, M. M. (2023). Changes in activities of antioxidant enzymes in radish (*Raphanus sativus*) seedlings in response to allelopathic effect of safflower (*Carthamus tinctorius*). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58.
- Muday, G. K., Murphy, A. S. (2002). An emerging model of auxin transport regulation. *The Plant Cell*, 14 (2), 293-299.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Na, X., Hu, Y., Yue, K., Lu, H., Jia, P., Wang, H., et al. (2011). Narciclasine modulates polar auxin transport in *Arabidopsis* roots. *Journal of Plant Physiology*, 168, 1149-1156.
- Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M. (2001). Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols. *Water Research*, 35 (7), 1855-1859.
- Nakamura, Y., Watanabe, S., Miyake, N., Kohno, H., Osawa, T. (2003). Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (11), 3309-3312.
- Negi, S., Ivanchenko, M. G., Muday, G. K. (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 55, 175-187.

- Nelson, N., Ben-Shem, A. (2004). The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 971–982.
- Nešković, M., Konjević, R., Čulafić, Lj. (2003). *Fiziologija biljaka*. NNK International, Beograd.
- Neyman, V., Quicray, M., Francis, F., Michaux, C. (2024). Toxicological, biochemical, and *in silico* investigations of three trehalase inhibitors for new ways to control aphids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 115 (4), e22112.
- Nguyen, G. T. T., Erlenkamp, G., Jäck, O., Küberl, A., Bott, M., Fiorani, F., et. al. (2016). Chalcone-based selective inhibitors of a C4 plant key enzyme as novel potential herbicides. *Scientific Reports*, 6, 27333.
- Nibau, C., Gibbs, D. J., Coates, J. C. (2008). Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytologist*, 179 (3), 595-614.
- Nicola, L., Vrhovsek, U., Evelyn, S., Insam, H., Pertot, I. (2017). Phlorizin released by apple root debris is related to apple replant disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 55, 432–442.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74 (4), 418-425.
- Ninković, S., Motyka, V., Stanišić, M., Smailagić, D., Živanović, B., Dobrev, P. I., et. al. (2024). Phytohormone profiling of *Malus domestica* and *Chenopodium murale* hairy root exudate: association with allelopathic effects. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-14.
- Nishida, N., Tamotsu, S., Nagata, N., Saito, C., Sakai, A. (2005). Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and dna synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 31 (5), 1187-1203.
- Nithiya, T., Udayakumar, R. (2016). *In vitro* antioxidant properties of phloretin—an important phytochemical. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4, 85–94.
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49 (1), 249-279.
- Novaes, P., de Carvalho Lopes, J., Ferreira, M. J. P., dos Santos, D. Y. A. C. (2024). Phytotoxicity of glycosylated flavonols extracted from *Annona coriacea* (Annonaceae) on germination and initial growth of standard target species and an invasive grass. *Brazilian Journal of Botany*, 47 (3), 625-635.
- Novák, O., Hényková, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospíšil, T., Ljung, K. (2012). Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *The Plant Journal*, 72 (3), 523-536.
- Nozue, M., Yamada, K., Nakamura, T., Kubo, H., Kondo, M., Nishimura, M. (1997). Expression of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant Physiology*, 115 (3), 1065.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144, 31–43.
- Ohtsuka, T., Ito, H., Tanaka, A. (1997). Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a and the assembly of chlorophyll with apoproteins by isolated chloroplasts. *Plant Physiology*, 113 (1), 137-147.

- Olson, L. P., Bruice, T. C. (1995). Electron tunneling and ab initio calculations related to one-electron oxidation of NADPH bound to catalase. *Biochemistry*, 34, 7335-7347.
- Ontiveros, M., Rinaldi, D., Marder, M., Espelt, M. V., Mangialavori, I., Vigil, M., et. al. (2019). Natural flavonoids inhibit the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Biochemical Pharmacology*, 166, 1-11.
- Oono, Y., Ooura, C., Rahman, A., Aspuria, E. T., Hayashi, K. I., Tanaka, A., et. al. (2003). p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. *Plant Physiology*, 133 (3), 1135-1147.
- Otto, G., Winkler, H., Szabó, K. (1993). Proof of Actinomycetes in rootlets of species of Rosaceae from a SARD soil-a contribution to the specificity of replant diseases. In III International Symposium on Replant Problems 363 (pp. 43-48).
- Owen, M. D., Zelaya, I. A. (2005). Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Management Science*, 61 (3), 301-311.
- Ozden, M., Demirel, U., Kahraman, A. (2009). Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H_2O_2 . *Scientia Horticulturae*, 119 (2), 163-168.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47.
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., Dwivedi, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 6 (1), 308.
- Pang, J., Cuin, T., Shabala, L., Zhou, M., Mendham, N., Shabala, S. (2007). Effect of secondary metabolites associated with anaerobic soil conditions on ion fluxes and electrophysiology in barley roots. *Plant Physiology*, 145 (1), 266-276.
- Pantoja, O. (2021). Recent advances in the physiology of ion channels in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 72 (1), 463-495.
- Papini, A., Mosti, S., Brighigna, L. (1999). Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma*, 207, 213-221.
- Parent, C., Capelli, N., Berger, A., Crèvecoeur, M., Dat, J. F. (2008). An overview of plant responses to soil waterlogging. *Plant Stress*, 2 (1), 20-27.
- Pařízková, B., Pernisová, M., Novák, O. (2017). What has been seen cannot be unseen – detecting auxin *in vivo*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (12), 2736.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixera, F., et. al. (2007). PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*, 68 (12), 1605-1611.
- Pasternak, T., Groot, E. P., Kazantsev, F. V., Teale, W., Omelyanchuk, N., Kovrizhnykh, V., et al. (2019). Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner. *Plant Physiology*, 180, 1725–1739.

- Pasternak, T., Palme, K., Pérez-Pérez, J. M. (2023). Role of reactive oxygen species in the modulation of auxin flux and root development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 114 (1), 83-95.
- Pasternak, T., Rudas, V., Potters, G., Jansen, M. A. (2005). Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 53 (3), 299-314.
- Pattanasupong, A., Nagase, H., Inoue, M., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M., et. al. (2004). Ability of a microbial consortium to remove pesticide, carbendazim and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 517-522.
- Patton, C. A., Ranney, T. G., Burton, J. D., Walgenbach, J. F. (1997). Feeding responses of Japanese beetle to naturally occurring metabolites found in rosaceous plants. *Journal of Environmental Horticulture*, 15 (4), 222-227.
- Pavlović, I., Pěňčík, A., Novák, O., Vujčić, V., Radić Brkanac, S., Lepeduš, H., et. al. (2018). Short-term salt stress in *Brassica rapa* seedlings causes alterations in auxin metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 125, 74–84.
- Pedrinho, A., Karas, P. A., Kanellopoulos, A., Feray, E., Korman, I., Wittenberg, G., et. al. (2024). The effect of natural products used as pesticides on the soil microbiota: OECD 216 nitrogen transformation test fails to identify effects that were detected via q-PCR microbial abundance measurement. *Pest Management Science*, 80, 2563-2576.
- Penariol, M. C., Monteiro A. C., Pitelli, R. A. (2008). Growth and sporulation of *Bipolaris euphorbiae* cultivated under different nutritional conditions. *Science Rural de Santa Maria*, 38, 1907–1913.
- Pěňčík, A., Casanova-Sáez, R., Pilařová, V., Žukauskaite, A., Pinto, R., Micol, J. L., et al. (2018). Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 69, 2569–2579.
- Pěňčík, A., Simonovik, B., Petersson, S. V., Henyková, E., Simon, S., Greenham, K., et. al. (2013). Regulation of auxin homeostasis and gradients in *Arabidopsis* roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *The Plant Cell*, 25 (10), 3858-3870.
- Peñuelas, J., Ribas-Carbo, M., Giles, L. (1996). Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. *Journal of Chemical Ecology*, 22 (4), 801-805.
- Pereira, L. A. R., Pina, G. O., Silveira, C. E. S., Gomes, S. M., Toledo, J. L. Borghetti, F. (2017). Effects of *Eugenia dysenterica* L. extracts on roots and gravitropism of *Sesamum indicum* L. and *Raphanus sativus* L. *Allelopathy Journal*, 42, 3-19.
- Perera, W. H., Meepagala, K. M., Fronczek, F. R., Cook, D. D., Wedge, D. E., Duke, S. O. (2019). Bioassay-guided isolation and structure elucidation of fungicidal and herbicidal compounds from *Ambrosia salsola* (Asteraceae). *Molecules*, 24, 835.
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplace, L., et. al. (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science*, 14 (7), 399-408.
- Péret, B., Li, G., Zhao, J., Band, L. R., Voß, U., Postaire, O., et. al. (2012). Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, 14 (10), 991-998.

- Péret, B., Middleton, A. M., French, A. P., Larrieu, A., Bishopp, A., Njo, M., et. al. (2013). Sequential induction of auxin efflux and influx carriers regulates lateral root emergence. *Molecular Systems Biology*, 9 (1), 699.
- Perry, J. J. P., Shin, D. S., Getzoff, E. D., Tainer, J. A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804 (2), 245-262.
- Petricka, J. J., Winter, C. M., Benfey, P. N. (2012). Control of Arabidopsis root development. *Annual Review of Plant Biology*, 63 (1), 563-590.
- Pfister, B., Zeeman, S. C. (2016). Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 2781-2807.
- Pham, V. N., Kathare, P. K., Huq, E. (2018). Phytochromes and phytochrome interacting factors. *Plant Physiology*, 176 (2), 1025-1038.
- Piskurewicz, U., Sentandreu, M., Iwasaki, M., Glauser, G., Lopez-Molina, L. (2023). The Arabidopsis endosperm is a temperature-sensing tissue that implements seed thermoinhibition through phyB. *Nature Communications*, 14 (1), 1202.
- Plaza, J. G. R., Morales-Nava, R., Diener, C., Schreiber, G., Gonzalez, Z. D., Ortiz, M. T. L., et. al. (2014). Cell penetrating peptides and cationic antibacterial peptides: two sides of the same coin. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (21), 14448-14457.
- Pohl, P., Rokitskaya, T. I., Pohl, E. E., Saparov, S. M. (1997). Permeation of phloretin across bilayer lipid membranes monitored by dipole potential and microelectrode measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1323 (2), 163-172.
- Pontais, I., Treutter, D., Paulin, J. P., Brisset, M. N. (2008) *Erwinia amylovora* modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiologia Plantarum*, 132, 262–271.
- Pop, T., Pamfil, D., Bellini, C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39 (1), 307-316.
- Porco, S., Pěňčík, A., Rashed, A., Voß, U., Casanova-Sáez, R., Bishopp, A., et. al. (2016). Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (39), 11016-11021.
- Pourata, R., Khataee, A. R., Aber, S., Daneshvar, N. (2009). Removal of the herbicide Bentazon from contaminated water in the presence of synthesized nanocrystalline TiO₂ powders under irradiation of UV-C light. *Desalination*, 249 (1), 301-307.
- Prabhakar, R., Morokuma, K., Musaev, D. G. (2006). A DFT study of the mechanism of Ni superoxide dismutase (NiSOD): role of the active site cysteine-6 residue in the oxidative half-reaction. *Journal of Computational Chemistry*, 27 (12), 1438–1445.
- Prasetya, D. N., Hamim, H., Sulistyaningsih, Y. C. (2022). Physiological and ultrastructural studies of *Jatropha curcas* and *Reutealis trisperma* in response to gold-mine tailings. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23 (7).

- Pucker, B., Selmar, D. (2022). Biochemistry and molecular basis of intracellular flavonoid transport in plants. *Plants*, 11 (7), 963.
- Qian, H., Xu, X., Chen, W., Jiang, H., Jin, Y., Liu, W., et. al. (2009). Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*, 75 (3), 368-375.
- Qian, J., Song, T., Zhang, Q., Cai, G., Cai, M. (2024). Analysis and diagnosis of hemolytic specimens by AU5800 biochemical analyzer combined with AI technology. *Frontiers in Computing and Intelligent Systems*, 6 (3), 100-3.
- Quint, M., Gray, W. M. (2006). Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (5), 448-453.
- Radl, V., Winkler, J. B., Kublik, S., Yang, L., Winkelmann, T., Vestergaard, G., et. al. (2019). Reduced microbial potential for the degradation of phenolic compounds in the rhizosphere of apple plantlets grown in soils affected by replant disease. *Environmental Microbiome*, 14 (1), 8.
- Rakhit, R., Chakrabartty, A. (2006). Structure, folding, and misfolding of Cu, Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1762 (11-12), 1025-1037.
- Rashtbari, S., Khataee, S., Iranshahi, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Hosseinzadeh, G., Dehghan, G. (2020). Experimental investigation and molecular dynamics simulation of the binding of ellagic acid to bovine liver catalase: Activation study and interaction mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 850-861.
- Reda, F., Mandoura, H. M. (2011). Response of enzymes activities, photosynthetic pigments, proline to low or high temperature stressed wheat plant (*Triticum aestivum* L.) in the presence or absence of exogenous proline or cysteine. *International Journal of Academic Research and Development*, 3 (4), 108-115.
- Redinbaugh, M. G., Sabre, M., Scandalios, J. G. (1990). Expression of the maize Cat3 catalase gene is under the influence of a circadian rhythm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (17), 6853-6857.
- Reezi, S., Kalantari, M. B. S., Okhovvat, S. M., Jeong, B. R. (2009). Silicon alleviates salt stress, decreases malondialdehyde content and affects petal color of salt-stressed cut rose (*Rosa x hybrida* L.) 'Hot Lady'. *African Journal of Biotechnology*, 8 (8), 1502.
- Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Plasser, L., Schwaiger, H., Furtmüller, P. G., Peschek, G. A., et. al. (2002). Occurrence and biochemistry of hydroperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (cyanobacteria). *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (6-8), 479-490.
- Ren, X., Liu, X., zhen Wang, B., Zhang, M., xuan Wang, L. (2024). Inhibitory mechanism of apigenin, quercetin, and phloretin on α -glucosidase. *Food Bioscience*, 62, 105398.
- Ren, X., Yan, Z., He, X., Li, X., Qin, B. (2017). Allelopathic effect of β -cembrenediol and its mode of action: Induced oxidative stress in lettuce seedlings. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29 (6).

- Rezk, B. M., Haenen, G. R. M. N., van der Vijgh, W. F. F., Bast, A. (2002). The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295, 9-13.
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8 (7), 797–807.
- Rietveld, W. J. (1983). Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. *Journal of Chemical Ecology*, 9, 295–308.
- Rittenberg, D., Foster, G. L. (1940). A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 133, 727–744.
- Román, G. C. (2007). Autism: transient in utero hypothyroxinemia related to maternal flavonoid ingestion during pregnancy and to other environmental antithyroid agents. *Journal of the Neurological Sciences*, 262, 15e26.
- Rook, F., Hadingham, S. A., Li, Y., Bevan, M. W. (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell and Environment*, 29, 426–434.
- Rose, T. L., Bonneau, L., Der, C., Marty-Mazars, D., Marty, F. (2006). Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biology of the Cell*, 98 (1), 53-67.
- Ross, J., Li, Y., Lim, E. K., Bowles, D. J. (2001). Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biology*, 2 (2), reviews3004-1.
- Rothe, G. M. (2002). Enzyme assays after gel electrophoresis. In: Eisinger, R., Danson, M. J. (eds.) *Enzyme assays, a practical approach*, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, p. 198.
- Rovira, C. (2005). Structure, protonation state and dynamics of catalase compound II. *ChemPhysChem*, 6, 1820-1826.
- Roycewicz, P., Malamy, J. E. (2012). Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on *Arabidopsis* root and shoot system growth in laboratory assays. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367 (1595), 1489-1500.
- Rueff, J., Gaspar, J., Laires, A. (1995). Structural requirements for mutagenicity of flavonoids upon nitrosation. A structure – activity study. *Mutagenesis*, 10 (4), 325-328.
- Růžicka, K., Šimášková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zažímalová, E., Simon, S., et al. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 4284–4289.
- Růžicka, K., Šimášková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zažímalová, E., Simon, S., et al. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (11), 4284-4289.
- Safo, M. K., Musayev, F. N., Wu, S. H., Abraham, D. J., Ko, T. P. (2001). Structure of tetragonal crystals of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallographica Section D*, 57, 1-7.
- Sairanen, I., Novak, O., Pěňčík, A., Ikeda, Y., Jones, B., Sandberg, G. et al. (2012). Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24 (12), 4907–4916.

- Sakthivel, S., Pavithra, G., Srimathi, K. (2023). Allelopathic potential of weeds in agriculture. In: Poovarasan, T., Yazhini, G., Abishek, R., Ilakiya, T. (eds.) Agriculture perspectives. Ryan Publishers, Trichy, Tamil Nadu, India, pp.132-152.
- Sampath, C., Rashid, M. R., Sang, S., Ahmedna, M. (2017). Specific bioactive compounds in ginger and apple alleviate hyperglycemia in mice with high fat diet-induced obesity via Nrf2 mediated pathway. Food Chemistry, 226, 79-88.
- Sampietro, D. A., Vattuone, M. A. (2006). Sugarcane straw and its phytochemicals as growth regulators of weed and crop plants. Plant Growth Regulation, 48, 21–27.
- Sánchez-Moreiras, A. M., Martínez-Peñalver, A., Reigosa, M. J. (2011). Early senescence induced by 2-3H-benzoxazolinone (BOA) in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Physiology, 168 (9), 863-870.
- Santos Wagner, A. L., Araniti, F., Bruno, L., Ishii-Iwamoto, E. L., Abenavoli, M. R. (2021). The steroid saponin protodioscin modulates *Arabidopsis thaliana* root morphology altering auxin homeostasis, transport and distribution. Plants, 10 (8), 1600.
- Saradhi, P., Alia, P., Arora, S., Prasad, K. V. (1995). Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 209, 1–5.
- Šarić, T. (1991). Korovi i njihovo uništavanje herbicidima. Zadrugar, Sarajevo.
- Scandalios, J. G., Tong, W. F., Roupakias, D. G. (1980). *Cat3*, a third gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize: genetics, intracellular location, and some biochemical properties. Molecular and General Genetics, 179, 33–41.
- Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., Krupinska, K., et. al. (2009). Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. Plant Cell, 21, 767–785.
- Schulz, B., Kolukisaoglu, H. Ü. (2006). Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? FEBS Lett 580, 1010–1016.
- Shaffer, G. Organic Herbicides. Available online: <https://extension.sdstate.edu/organic-herbicides> (13.8.2025).
- Shams, M., Pokora, W., Khadivi, A., Aksmann, A. (2024). Superoxide dismutase in *Arabidopsis* and *Chlamydomonas*: diversity, localization, regulation, and role. Plant and Soil, 1-21.
- Sharma, P., Bal, T., Singh, S. K., Sharma, N. (2024). Biodegradable polymeric nanocomposite containing phloretin for enhanced oral bioavailability and improved myocardial ischaemic recovery. Journal of Microencapsulation, 41 (8), 754-769.
- Sharma, S., Bhatt, U., Sharma, J., Kalaji, H. M., Mojski, J., Soni, V. (2022). Ultrastructure, adaptability, and alleviation mechanisms of photosynthetic apparatus in plants under waterlogging: A review. Photosynthetica, 60 (3), 430-444.
- Sharp, K. H., Mewies, M., Moody, P. C., Raven, E. L. (2003). Crystal structure of the ascorbate peroxidase–ascorbate complex. Nature Structural and Molecular Biology, 10 (4), 303-307.

- Shearer, J., Peck, K. L., Schmitt, J. C., Neupane, K. P. (2014). Cysteinate protonation and water hydrogen bonding at the active-site of a nickel superoxide dismutase metalloprotein-based mimic: implications for the mechanism of superoxide reduction. *Journal of the American Chemical Society*, 136 (45), 16009–16022.
- Sheen, J. (2014). Master regulators in plant glucose signaling networks. *Journal of Plant Biology*, 57 (2), 67–79.
- Shelke, V., Kale, A., Kulkarni, Y. A., Gaikwad, A. B. (2024). Phloretin: a comprehensive review of its potential against diabetes and associated complications. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 76, 201-212.
- Shibasaki, K., Uemura, M., Tsurumi, S., Rahman, A. (2009). Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: underlying molecular mechanisms. *Plant Cell*, 21, 3823–3838.
- Shiffler, A. (2025). Cities limiting use of lawn fertilizers and pesticides. *Lawn Love*, <https://lawnlove.com/blog/cities-limiting-lawn-chemicals/>
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132 (2), 199-208.
- Shy, G., Ehler, L., Herman, E., Galili, G. (2001). Expression patterns of genes encoding endomembrane proteins support a reduced function of the Golgi in wheat endosperm during the onset of storage protein deposition. *Journal of Experimental Botany*, 52 (365), 2387-2388.
- Silva, M. C., Terra, W. R., Ferreira, C. (2006). Absorption of toxic β -glucosides produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 143 (3), 367-373.
- Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., Todorović, M. (2007). Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, 12, 2327.
- Singh H. P., Batish D. R., Kohli R. K. (2003). Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 239.
- Singh, H. P., Kaur, S., Mittal, S., Batish, D. R., Kohli, R. K. (2009). Essential oil of *Artemisia scoparia* inhibits plant growth by generating reactive oxygen species and causing oxidative damage. *Journal of Chemical Ecology*, 35 (2), 154-162.
- Singh, S., Pandey, V. P., Naaz, H., Dwivedi, U. N. (2012). Phylogenetic analysis, molecular modeling, substrate–inhibitor specificity, and active site comparison of bacterial, fungal, and plant heme peroxidases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 59 (4), 283-294.
- Sirikantaramas, S., Yamazaki, M., Saito, K. (2008). Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochemistry Reviews*, 7 (3), 467-477.
- Siripornadulsil, S., Train, S., Verma, D. P. S., Sayre, R. T. (2002). Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell*, 14:2837–2847.
- Slatnar, A., Mikulic Petkovsek, M., Halbwirth, H., Stampar, F., Stich, K., Veberic, R. (2010). Response of the phenylpropanoid pathway to *Venturia inaequalis* infection in maturing fruit of ‘Braeburn’ apple. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85 (6), 465-472.

- Sleator, R. D., Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 49–71.
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 229–35.
- Smirnoff, N., Wheeler, G. L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19 (4), 267–290.
- Smith, H. S. (1919). On some phases of insect control by the biological method. *Journal of Economic Entomology*, 12, 288–292.
- Smith, A. M., Zeeman, S. C. (2006). Quantification of starch in plant tissues. *Nature Protocols*, 1 (3), 1342–1345.
- Smith, R. S., Guyomarc'h, S., Mandel, T., Reinhardt, D., Kuhlemeier, C., Prusinkiewicz, P. (2006). A plausible model of phyllotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 1301–1306.
- Smolko, A., Bauer, N., Pavlovi, I., Pěňčík, A., Salopek-Sondi, A. (2021). Altered root growth, auxin metabolism and distribution in *Arabidopsis thaliana* exposed to salt and osmotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7993.
- Soltys, D., Rudzińska-Langwald, A., Gniazdowska, A., Wiśniewska, A., Bogatek, R. (2012). Inhibition of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) root growth by cyanamide is due to altered cell division, phytohormone balance and expansin gene expression. *Planta*, 236, 1629–1638.
- Soltys, D., Rudzińska-Langwald, A., Kurek, W., Gniazdowska, A., Sliwinska, E. Bogatek, R. (2011). Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. *Planta*, 234 (3), 609–621.
- Soltys, D., Rudzińska-Langwald, A., Kurek, W., Szajko, K., Sliwinska, E., Bogatek, R., et. al. (2014). Phytotoxic cyanamide affects maize (*Zea mays*) root growth and root tip function: from structure to gene expression. *Journal of Plant Physiology*, 171 (8), 565–575.
- Srnec, M., Aquilante, F., Ryde, U., Rulisek, L. (2009). Reaction mechanism of manganese superoxide dismutase studied by combined quantum and molecular mechanical calculations and multiconfigurational methods. *Journal of Physical Chemistry B*, 113 (17), 6074–6086.
- Stahl, W., Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24 (6), 345–351.
- Stanišić, M., Ćosić, T., Savić, J., Krstić-Milošević, D., Mišić, D., Smigocki, A., et. al. (2019). Hairy root culture as a valuable tool for allelopathic studies in apple. *Tree Physiology*, 39, 888–905.
- Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C., et. al. (2005). Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant Cell*, 17 (2), 616–627.
- Staszek, P., Krasuska, U., Ciacka, K., Gniazdowska, A. (2021). ROS metabolism perturbation as an element of mode of action of allelochemicals. *Antioxidants*, 10 (11), 1648.

- Steffens, D., Hutsch, B. W., Eschholz, T., Losak, T., Schubert, S. (2005). Water logging may inhibit plant growth primarily by nutrient deficiency rather than nutrient toxicity. *Plant Soil and Environment*, 51 (12), 545.
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., et. al. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94 (3), 665-676.
- Stolarz, M. (2009). Circumnutation as a visible plant action and reaction: physiological, cellular and molecular basis for circumnutations. *Plant Signaling and Behavior*, 4 (5), 380-387.
- Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., et al. (2011). Glutathioneindole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 23, 364–380.
- Suarez-Fernandez, M., Marhuenda-Egea, F. C., Lopez-Moya, F., Arnao, M. B., Cabrera-Escribano, F., Nueda, M. J., et. al. (2020). Chitosan induces plant hormones and defenses in tomato root exudates. *Frontiers in Plant Science*, 11, 572087.
- Subtain, M. U., Hussain, M., Tabassam, M. A. R., Ali, M. A., Ali, M., Mohsin, M., et. al. (2014). Role of allelopathy in the growth promotion of plants. *Scientia Agriculturae*, 2 (3), 141-145.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., et al. (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoximedependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 5430–5435.
- Sun, N., Yang, C., Qin, X., Liu, Y., Sui, M., Zhang, Y., et. al. (2022). Effects of organic acid root exudates of *Malus hupehensis* Rehd. derived from soil and root leaching liquor from orchards with apple replant disease. *Plants*, 11 (21), 2968.
- Sun, P., Tian, Q. Y., Chen, J., Zhang, W. H. (2010). Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*, 61, 347–356.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., et. al. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, 10 (8), 946-954.
- Szabados, L., Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15 (2), 89-97.
- Taïbi, K., Taïbi, F., Abderrahim, L. A., Ennajah, A., Belkhodja, M., Mulet, J. M. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 105, 306-312.
- Takahashi, M., Kono, Y., Kurahashi, H., Matsushita, K., Nishina, M., Kameda, Y. (1995). Effect of a trehalase inhibitor, validoxylamine A, on three species of flies. *Applied Entomology and Zoology*, 30 (1), 231-239.
- Takahashi, S., Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*, 13, 178–182.
- Takamiya, K. I., Tsuchiya, T., Ohta, H. (2000). Degradation pathway(s) of chlorophyll: What has gene cloning revealed? *Trends in Plant Science*, 5, 426–431.

- Talebzadeh, F., Valeo, C. (2022). Evaluating the effects of environmental stress on leaf chlorophyll content as an index for tree health. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1006 (1). IOP Publishing.
- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P. B., Friml, J. (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 63, 2738-2754.
- Tanner, C. M., Ross, G. W., Jewell, S. A., Hauser, R. A., Jankovic, J., Factor, S. A., et. al. (2009). Occupation and risk of parkinsonism. Archives of Neurology, 66, 1106e1113.
- Tawaha, A. M., Turk, M. A. (2003). Allelopathic effects of Black Mustard (*Brassica nigra*) on germination and growth of Wild Barley (*Hordeum spontaneum*). Journal of Agronomy and Crop Science, 189, 298–303.
- Taylor, I., Lehner, K., McCaskey, E., Nirmal, N., Ozkan-Aydin, Y., Murray-Cooper, M., et. al. (2021). Mechanism and function of root circumnutation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 118 (8), e2018940118.
- Teale, W. D., Paponov, I. A., Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7 (11), 847-859.
- Terasaka, K., Blakeslee, J. J., Titapiwatanakun, B., Peer, W. A., Bandyopadhyay, A., Makam, S. N., et al. (2005). PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. Plant Cell, 17 (11), 2922–2939.
- Těšitel, J. (2016). Functional biology of parasitic plants: a review. Plant Ecology and Evolution, 149 (1), 5-20.
- Tewari, K. A., Tripathy, C. B. (1998). Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat. Plant Physiology, 117 (3), 851-858.
- Thakur, Y., Pande, R. (2021). Exploration of *In-silico* screening of therapeutic agents against SARS-CoV-2. Chemical Physics, 551, 111354.
- Thalmann, M., Santelia, D. (2017). Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. New Phytologist, 214 (3), 943-951.
- Thion, L., Mazars, C., Nacry, P., Bouchez, D., Moreau, M., Ranjeva, R. et al. (1998). Plasma membrane depolarisation-activated calcium channels, stimulated by microtubuledepolymerizing drugs in wild type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a longer half life in ton2 mutant cells affected in the organization of cortical microtubules. The Plant Journal, 13 (5), 603–10.
- Thomas, C. E., McLean, L. R., Parker, R. A., Ohlweiler, D. F. (1992). Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. Lipids, 27, 543-50.
- Thomma, B. P. H. J., Nelissen, I., Eggermont, K., Broekaert, W. F. (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. The Plant Journal, 19, 163–171.

- Thompson, S. N. (2003). Trehalose – the insect ‘blood’sugar. *Advances in Insect Physiology*, 31, 205-285.
- Timari, S., Cerea, R., Várnagy, K. (2011). Characterization of CuZnSOD model complexes from a redox point of view: Redox properties of copper(II) complexes of imidazole containing ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 1009–1017.
- Tobena-Santamaria, R., Bliet, M., Ljung, K., Sandberg, G., Mol, J. N. M., Souer, E., et. al. (2002). FLOOZY of petunia is a flavin monooxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes and Development*, 16, 753–763.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., Simon, P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 288 (1-2), 129-138.
- Tohge, T., Fernie, A. R. (2010). Combining genetic diversity, informatics and metabolomics to facilitate annotation of plant gene function. *Nature Protocols*, 5 (6), 1210-1227.
- Topal, S., Kocacaliskan, I., Arslan, O., Tel, A. Z. (2007). Herbicidal effects of juglone as an allelochemical. *Phyton*, 46 (2), 259-269.
- Trott, O., Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31 (2), 455-461.
- Tsugeki, R., Fedoroff, N. V. (1999). Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 12941–12946.
- Tsuji, J., Jackson, E. P., Gage, D. A., Hammerschmidt, R., Somerville, S. C. (1992). Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology*, 98, 1304–1309.
- Tuli, H. S., Rath, P., Chauhan, A., Ramniwas, S., Vashishth, K., Varol, M., et. al. (2022). Phloretin, as a potent anticancer compound: from chemistry to cellular interactions. *Molecules*, 27, 8819.
- Turner, A., Chen, S. N., Joike, M. K., Pendland, S. L., Pauli, G. F., Farnsworth, N. R. (2005). Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* by cranberry juice: a new antiadherence assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8940-47.
- Tyagi, S., Shumayla, Singh, S. P., Upadhyay, S. K. (2019). Role of superoxide dismutases (SODs) in stress tolerance in plants. In: Singh, S., Upadhyay, S., Pandey, A., Kumar, S. (eds.) *Molecular approaches in plant biology and environmental challenges*, Springer, Singapore, pp 51-77.
- Utkhede, R. S. (2006). Soil sickness, replant problem or replant disease and its integrated control. *Allelopathy Journal*, 18, 23–38.
- van de Weert, M., Lagerwerf, F. M., Haverkamp, J., Heerma, W. (1998). Mass spectrometric analysis of oxidized tryptophan. *Journal of Mass Spectrometry*, 33 (9), 884-891.
- Vanneste, S., Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136 (6), 1005-1016.

- Varadharajan, V., Rajendran, R., Muthuramalingam, P., Runthala, A., Madhesh, V., Swaminathan, G., et. al. (2025). Multi-omics approaches against abiotic and biotic stress – a review. *Plants*, 14 (6), 865.
- Vats, S. (2015). Herbicides: history, classification and genetic manipulation of plants for herbicide resistance. *Sustainable Agriculture Reviews*, 15, 153-192.
- Velikova, V., Yordanov, I. Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous poly-amines. *Plant Science*, 151, 59-66.
- Veljović Jovanović, S., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F., Menckhoff, L. (2018). Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In: *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants* (pp. 269-300). Cham: Springer International Publishing.
- Verbruggen, N., Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids*, 35 (4), 753-759.
- Verbruggen, N., Villarroel, R., Van Montagu, M. (1993). Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 103, 771–781.
- Verdeguer, M., Sánchez-Moreiras, A. M., Araniti, F. (2020). Phytotoxic effects and mechanism of action of essential oils and terpenoids. *Plants*, 9 (11), 1571.
- Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., et. al. (2008). Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Science*, 13, 151–159.
- Verstraeten, I., Schotte, S., Geelen, D. (2014). Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 100160.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wiśniewska, J., Benková, E., Benjamins, R., Beeckman, T., et al. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross regulation of PIN expression. *Development*, 132, 4521–4531.
- Vorwerk, S., Biernacki, S., Hillebrand, H., Janzik, I., Müller, A., Weiler, E. W., et. al. (2001). Enzymatic characterization of the recombinant *Arabidopsis thaliana* nitrilase subfamily encoded by the NIT2/NIT1/NIT3-gene cluster. *Planta*, 212, 508–516.
- Vrbničanin S., Šinžar B. (2003). Elementi herbologije sa praktikumom, Poljoprivredni fakultet, Zemun, Zavet, Beograd.
- Wang, H., Jian, L., Wang, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Ma, F., et. al. (2024). Glycosylation mode of phloretin affects the morphology and stress resistance of apple plant. *Plant, Cell and Environment*, 47 (11), 4398-4415.
- Wang, Q. Q., Hu, Y. L., Zhou, H., Zhan, X., Mao, Z. Q., Zhu, S. H. (2012). Effects of phloridzin on the tri-carboxylic acid cycle enzymes of roots of *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Agricultura Sinica*, 45, 3108-114.
- Wang, Y., Ding, Y., Zhao, Q., Wu, C., Deng, C. H., Wang, J., et. al. (2023a). Dihydrochalcone glycoside biosynthesis in *Malus* is regulated by two MYB-like transcription factors and is required for seed development. *The Plant Journal*, 116 (5), 1492-1507.

- Wang, Y., Dong, B., Wang, D., Jia, X., Zhang, Q., Liu, W., et. al. (2023b). Investigation into the binding site of (-)-Spirobrassinin for herbicidal activity using molecular docking and molecular dynamics simulations. *Applied Sciences*, 13 (12), 7287.
- Wang, Y., Yauk, Y. K., Zhao, Q., Hamiaux, C., Xiao, Z., Gunaseelan, K., et. al. (2020). Biosynthesis of the dihydrochalcone sweetener trilobatin requires phloretin glycosyltransferase2. *Plant Physiology*, 184 (2), 738-752.
- Wang, Y., Yu, B., Zhao, J., Guo, J., Li, Y., Han, S., et. al. (2013). Autophagy contributes to leaf starch degradation. *Plant Cell*, 25 (4), 1383-1399.
- Wang, Y., Zhao, Y., Dong, B., Wang, D., Hao, J., Jia, X., et. al. (2023). The aqueous extract of *Brassica oleracea* L. exerts phytotoxicity by modulating H₂O₂ and O₂⁻ levels, antioxidant enzyme activity and phytohormone levels. *Plants*, 12 (17), 3086.
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., Goliński, P. (2014). Nonenzymatic antioxidants in plants. In: Ahmad, P. (ed.) *Oxidative damage to plants*. Academic Press, pp. 201-234.
- Wegener, G., Tschiedel, V., Schlöder, P., Ando, O. (2003). The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *Journal of Experimental Biology*, 206 (7), 1233-1240.
- Weiβ, S., Liu, B., Reckwell, D., Beerhues, L., Winkelmann, T. (2017). Impaired defense reactions in apple replant disease-affected roots of *Malus domestica* ‘M26’. *Tree Physiology*, 37, 1672–1685.
- Weiste, C., Pedrotti, L., Selvanayagam, J., Muralidhara, P., Fröschel, C., Novák, O. et al. (2017). The Arabidopsis bZIP11 transcription factor links low-energy signalling to auxin-mediated control of primary root growth. *PLoS Genetics*, 13 (2), e1006607.
- Wen, J., Chen, S., Deng, L., Chen, X., Jiang, X., Hu, X., et. al. (2024). Inhibitory mechanism of phloretin on xanthine oxidase and its synergistic effect with allopurinol and febuxostat. *Food Bioscience*, 61, 104720.
- Weston, L. A., Mathesius, U. (2013). Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 283-297.
- White, P. J. (1998). Calcium channels in the plasma membrane of root cells. *Annals of Botany*, 81, 173–83.
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M., Van Camp, W. (1995). Catalases in plants. *Molecular Breeding*, 1, 207-228.
- Williams M. W. (1994). New chemical approaches for control of biennial bearing of apples, bioregulators for crop protection and pest control, *ACS Symposium Series*, 557 (2), 16–25.
- Winkelmann, T., Smalla, K., Amelung, W., Baab, G., Grunewaldt-Stöcker, G., Kanfra, X., et. al. (2019). Apple replant disease: causes and mitigation strategies. *Current Issues in Molecular Biology*, 30 (1), 89-106.
- Woodbury, W., Spencer, A. K., Stahmann, M. A. (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry*, 44, 301–305.

Woodward, A. W., Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95 (5), 707-735.

www.weedscience.org (29.04.2026) The International Herbicide-Resistant Weed Database.

Xiang, L., Wang, M., Jiang, W., Wang, Y., Chen, X., Yin, C., et. al. (2021). Key indicators for renewal and reconstruction of perennial trees soil: Microorganisms and phloridzin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 225, 112723.

Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496 (7444), 181–186.

Xu, L., Li, Y., Dai, Y., Peng, J. (2018). Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Pharmacological Research*, 130, 451–465.

Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., Cui, L. (2006). Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environmental and Experimental Botany*, 56 (3), 274-285.

Xu, S., Li, Y., Li, B., He, X., Chen, W., Yan, K. (2022). Responses of growth, oxidative injury and chloroplast ultrastructure in leaves of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea* to elevated O₃ concentrations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5153.

Yan, S., Che, G., Ding, L., Chen, Z., Liu, X., Wang, H., et al. (2016). Different cucumber CsYUC genes regulate response to abiotic stresses and flower development. *Scientific Reports*, 6, 1–12.

Yan, Z. Q., Jin, H., Wang, D. D., Yang, X. Y., Qin, B. (2015). The effect of ellagic acid on the root gravitropic response in *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62, 664–669.

Yan, Z., Wang, D., Cui, H., Sun, Y., Yang, X., Jin, H., et al. (2018). Effects of artemisinin on root gravitropic response and root system development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 85, 211–220.

Yan, Z., Wang, D., Cui, H., Zhang, D., Sun, Y., Jin, H., et. al. (2016). Phytotoxicity mechanisms of two coumarin allelochemicals from *Stellera chamaejasme* in lettuce seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 248.

Yang, J., He, H., He, Y., Zheng, Q., Li, Q., Feng, X., et. al. (2021). TMK1-based auxin signaling regulates abscisic acid responses via phosphorylating ABI1/2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118 (24), e2102544118.

Yao, G. M., Ding, Y., Zuo, J. P., Wang, H. B., Wang, Y. B., Ding, B. Y., et. al. (2005). Dihydrochalcones from the Leaves of *Pieris japonica*. *Journal of Natural Products*, 68 (3), 392-396.

Yazaki, K., Sugiyama, A., Morita, M., Shitan, N. (2008). Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 7, 513–524.

Yazid, H., Grich, A., Bahsis, L., Regti, A., El Himri, M., El Haddad, M. (2024). Exploring and studying the adsorption mechanisms of the herbicides 2, 4, 5-T and 2, 4-D on activated carbon from

walnut shells, using theoretical DFT analyses and a central composite design. *Results in Surfaces and Interfaces*, 14, 100192.

Yim, B., Smalla, K., Winkelmann, T. (2013). Evaluation of apple replant problems based on different soil disinfection treatments-links to soil microbial community structure? *Plant Soil*, 366, 617–631.

Yin, C., Duan, Y., Xiang, L., Wang, G., Zhang, X., Shen, X., et. al. (2018). Effects of phloridzin, phloretin and benzoic acid at the concentrations measured in soil on the root proteome of *Malus hupehensis* Rehd seedlings. *Scientia Horticulturae*, 228, 10–17.

Yin, C., Xiang, L., Wang, G., Wang, Y., Shen, X., Chen, X., et. al. (2016). How to plant apple trees to reduce replant disease in apple orchard: a study on the phenolic acid of the replanted apple orchard. *PLoS One*, 11, e0167347.

Yu, Z., Zhang, F., Friml, J., Ding, Z. (2022). Auxin signaling: Research advances over the past 30 years. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64 (2), 371-392.

yuan Zhao, Y., Fan, Y., Wang, M., Wang, J., xue Cheng, J., bo Zou, J., et. al. (2020). Studies on pharmacokinetic properties and absorption mechanism of phloretin: *In vivo* and *in vitro*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 132, 110809.

Yuan, H. M., Huang, X. (2016). Inhibition of root meristem growth by cadmium involves nitric oxide-mediated repression of auxin accumulation and signalling in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*, 39, 120–135.

Yuan, H. M., Xu, H. H., Liu, W. C., Lu, Y. T. (2013). Copper regulates primary root elongation through PIN1-mediated auxin redistribution. *Plant and Cell Physiology*, 54, 766–778.

Yuan, X., Xu, P., Yu, Y., Xiong, Y. (2020). Glucose-TOR signaling regulates PIN2 stability to orchestrate auxin gradient and cell expansion in *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (51), 32223-32225.

Yun, M. S., Chen, W., Deng, F., Yogo, Y. (2009). Selective growth suppression of five annual plant species by chalcone and naringenin correlates with the total amount of 4-coumarate: coenzyme A ligase. *Weed Biology and Management*, 9, 27-37.

Zahra, N., Al Hinai, M. S., Hafeez, M. B., Rehman, A., Wahid, A., Siddique, K. H., et. al. (2022). Regulation of photosynthesis under salt stress and associated tolerance mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 178, 55-69.

Zarei, M., Rahbar, M. R., Negahdaripour, M. (2022). Interaction of indole-3-acetic acid with horseradish peroxidase as a potential anticancer agent: from docking to molecular dynamics simulation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40 (9), 4188-4196.

Zažímalová, E., Murph, A. S., Yang, H., Hoyerová, K., Hošek, P. (2010). Auxin transporters – why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 1–15.

Zažímalová, E., Napier, R. M. (2003). Points of regulation for auxin action. *Plant Cell Reports*, 21, 625-634.

Zechmann, B. (2019). Ultrastructure of plastids serves as reliable abiotic and biotic stress marker. *PLoS One*, 14 (4), e0214811.

- Zhang, H., Hassan, Y. I., Liu, R., Mats, L., Yang, C., Liu, C., et. al. (2020a). Molecular mechanisms underlying the absorption of aglycone and glycosidic flavonoids in a Caco-2 BBe1 cell model. *ACS Omega*, 5 (19), 10782-10793.
- Zhang, J. H., Mao, Z. Q., Wang, L. Q., Shu, H. R. (2007). Bioassay and identification of root exudates of three fruit tree species. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, 257–261.
- Zhang, J., Lin, J. E., Harris, C., Campos Mastrotti Pereira, F., Wu, F., Blakeslee, J. J., et. al. (2016). DAO1 catalyzes temporal and tissue-specific oxidative inactivation of auxin in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (39), 11010-11015.
- Zhang, R. T., Xu, Y., Wang, Q. W. (2018a). Study on the stability of phloretin by HPLC. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 33, 80-83.
- Zhang, S., Sun, S. W., Shi, H. L., Zhao, K., Wang, J., Liu, Y., et. al. (2020b). Physiological and biochemical mechanisms mediated by allelochemical isoliquiritigenin on the growth of lettuce seedlings. *Plants*, 9 (2), 245.
- Zhang, W., Lu, L. Y., Hu, L. Y., Cao, W., Sun, K., Sun, Q. B., et al. (2018b). Evidence for the involvement of auxin, ethylene and ROS signaling during primary root inhibition of *Arabidopsis* by the allelochemical benzoic acid. *Plant and Cell Physiology*, 59, 1889–1904.
- Zhang, Z., Liu, Y., Yuan, L., Weber, E., van Kleunen, M. (2021). Effect of allelopathy on plant performance: a meta-analysis. *Ecology Letters*, 24 (2), 348-362.
- Zhao, C. Z., Huang, J., Gyaneshwar, P., Zhao, D. (2018). *Rhizobium* sp. IRBG74 alters *Arabidopsis* root development by affecting auxin signaling. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2556.
- Zhao, J., He, Y., Zhang, H., Wang, Z. (2024). Advances in the molecular regulation of seed germination in plants. *Seed Biology*, 3 (1).
- Zhao, J., Williams, C. C., Last, R. L. (1998). Induction of *Arabidopsis* tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. *Plant Cell*, 10, 359–370.
- Zhao, X., Wang, J., Yuan, J., Wang, X. L., Zhao, Q. P., Kong, P. T., et. al. (2015). NITRIC OXIDE-ASSOCIATED PROTEIN1 (At NOA 1) is essential for salicylic acid-induced root waving in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 207 (1), 211-224.
- Zhao, Y., Hull, A. K., Gupta, N. R., Goss, K. A., Alonso, J., Ecker, J. R., et al. (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes and Development*, 16, 3100–3112.
- Zhao, Y., Li, X., Zeng, X., Huang, S., Hou, S., Lai, X. (2014). Characterization of phenolic constituents in *Lithocarpus polystachyus*. *Analytical Methods*, 6 (5), 1359-1363.
- Zheng, J., Pan, W., Liu, M., Yu, Y., Zhao, Y., Su, K., et. al. (2025). Antioxidant profiling and quality assessment of *Lithocarpus polystachyus* sweet tea using LC-ECD and LC-MS/MS. *Scientific Reports*, 15 (1), 13163.
- Zheng, W., Chen, C., Zhang, C., Cai, L., Chen, H. (2018). The protective effect of phloretin in osteoarthritis: an *in vitro* and *in vivo* study. *Food and Function*, 9 (1), 263-278.

- Zheng, Z., Guo, Y., Novák, O., Chen, W., Ljung, K., Noel, J. P., et. al. (2016). Local auxin metabolism regulates environment-induced hypocotyl elongation. *Nature Plants*, 2 (4), 1-9.
- Zhong, H. H., Young, J. C., Pease, E. A., Hangarter, R. P., McClung, C. R. (1994). Interactions between light and the circadian clock in the regulation of CAT2 expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 104 (3), 889-898.
- Zhou, G., Liu, C., Cheng, Y., Ruan, M., Ye, Q., Wang, R., et. al. (2022). Molecular evolution and functional divergence of stress-responsive Cu/Zn superoxide dismutases in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (13), 7082.
- Zhou, K., Hu, L., Li, P., Gong, X., Ma, F. (2017). Genome-wide identification of glycosyltransferases converting phloretin to phloridzin in *Malus* species. *Plant Science*, 265, 131–145.
- Zhou, Y., Sun, M., Sun, P., Gao, H., Yang, H., Yang, H., et. al. (2022). Tonoplast inositol transporters: Roles in plant abiotic stress response and crosstalk with other signals. *Journal of Plant Physiology*, 271, 153660.
- Zhu, W., Liu, J., Ye, J., Li, G. (2017). Effects of phytotoxic extracts from peach root bark and benzoic acid on peach seedlings growth, photosynthesis, antioxidance and ultrastructure properties. *Scientia Horticulturae*, 215, 49-58.
- Zhu, Z., Liu, Y., Zhang, P., Zeng, G., Hu, X., Li, H., et. al. (2014). Co-culture with *Cyperus alternifolius* induces physiological and biochemical inhibitory effects in *Microcystis aeruginosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 118-124.
- Zimdahl, R. L., Basinger, N. T. (2024). *Fundamentals of weed science*. Elsevier.
- Živadinović, R. (1999) – *Pesticidi i pčele*. Biljni lekar, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Novi Sad.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dijana Smailagić rođena je 25. decembra 1990. godine u Beogradu, gde je završila osnovno i srednje obrazovanje. Osnovne akademske studije upisala je školske 2010/2011. godine na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biljna proizvodnja, smer Voćarstvo i vinogradarstvo, gde je diplomirala u januaru 2016. godine. Master akademske studije završila je 2017. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, na Departmanu za biologiju i ekologiju, na studijskom programu Botanika. Doktorske akademske studije upisala je školske 2020/2021. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biologija, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka.



Od juna 2021. godine zaposlena je kao istraživač na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju (IBISS), na Odeljenju za fiziologiju biljaka. Autor je više naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima, jednog revijalnog rada i većeg broja saopštenja na nacionalnim i međunarodnim naučnim skupovima. Dobitnica je treće nagrade za najbolji studentski poster na međunarodnoj konferenciji *4th International Conference on Plant Biology*, održanoj od 6. do 8. oktobra 2022. godine u Beogradu. Na poziv prof. dr Velemira Ninkovića, u januaru 2023. godine pohađala je međunarodni kurs *Plant Communication and Trophic Interactions: From Plant Behaviour to Sustainable Crops*, održan u Lillsvedu, u Švedskoj. Više puta je predstavljala Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ na Sajmu tehnike i tehničkih dostignuća, gde je prezentovala primenu tehnologije *in vitro* u gajenju batata.

Član je Srpskog biološkog društva (SBD), Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS), Federacije evropskih društava za biljnu fiziologiju (FESPB) i Međunarodnog društva za alelopatiju (IAS).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Дијана Смаилагић _____

број индекса _____ Б3002/2020 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекат флоретина као потенцијалног биохербицида на физиолошке процесе код
модел-биљке *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Дијана Смаилагић

Број индекса Б3002/2020

Студијски програм Физиологија и молекуларна биологија биљака

Наслов рада Ефекат флоретина као потенцијалног биохербицида на
физиолошке процесе код модел-биљке *Arabidopsis thaliana* (L.)
Heynh.

Ментори др Мариана Станишић, проф. др Анета Сабовљевић

Потписани/а _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Ефекат флоретина као потенцијалног биохербицида на физиолошке процесе код модел-биљке *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

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