

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jasmina M. Nestorović Živković

**ANTIOKSIDATIVNO, ANTIMIKROBNO I  
ALELOPATSKO DEJSTVO  
TRI ENDEMIČNE VRSTE RODA *Nepeta*  
(*Lamiaceae*)**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jasmina M. Nestorović Živković

**ANTIOXIDATIVE, ANTIMICROBIAL AND  
ALLELOPATHIC EFFECTS OF  
THREE ENDEMIC *Nepeta* SPECIES  
(*Lamiaceae*)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentori:

**Naučni saradnik dr Danijela Mišić**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

**Docent dr Aneta Sabovljević**

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Članovi komisije:

**Naučni saradnik dr Suzana Živković**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

**Naučni saradnik dr Ana Ćirić**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

Datum odbrane:

*Eksperimentalni deo doktorske teze je urađen u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i u laboratorijama Odeljenja za fiziku životne sredine Instituta za fiziku, Univerziteta u Beogradu. Doktorska disertacija je urađena u okviru projekta osnovnih istraživanja „Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju ex situ zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja”, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (ON173024).*

*Srdačno se zahvaljujem svom dragom mentoru dr Danijeli Mišić na strpljenju i podršci tokom izrade doktorske disertacije! Posebno želim da joj se zahvalim na uloženom trudu, stručnoj pomoći, interesantnim idejama, smernicama i stečenom znanju, koji su bili ključni za izradu ove teze. Posebnu zahvalnost dugujem dr Suzani Živković za angažovanje u realizaciji eksperimenata iz oblasti antioksidativnih enzima i za pomoć oko uobličavanja teksta. Naravno, želim da joj se zahvalim i na velikoj podršci i razumevanju. Veliko zadovoljstvo i čast je raditi u društvu pozitivnih osoba koje imaju rešenje za svaki problem!*

*Zahvaljujem se svom mentoru dr Aneti Sabovljević na korisnim savetima i angažovanju na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, u realizaciji doktorske disertacije. Veliku zahvalnost dugujem dr Ani Ćirić na angažovanju u realizaciji eksperimenata iz oblasti antimikrobnog dejstva, i pomoći u tumačenju i prezentovanju rezultata, takođe zahvalnost u realizaciji eksperimenata iz iste oblasti dugujem i dr Jasmini Glamočliji i dr Marini Soković.*

*Svojim kolegama sa Instituta za fiziku, dr Neveni Puač, Andreji Stojić i Mirjani Perišić zahvaljujem se na dugogodišnjoj uspešnoj saradnji, kao i u tumačenju i predstavljanju rezultata PTR-MS analiza.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Vuku Maksimović za realizaciju eksperimenata iz oblasti fitohemijskih HPLC analiza. Ovom prilikom želim da se zahvalim i dr Mihajlu Ristiću iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „dr Josif Pančić“ na realizaciji eksperimenata iz oblasti fitohemijskih GC-MS i GC-FID analiza.*

*Kolegi iz Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine dr Vladanu Jovanović želim da se zahvalima na ustupljenim semenima poljoprivrednih i korovskih biljnih vrsta koja su nam bila neophodna za realizaciju eksperimenata iz oblasti alelopatkog dejstva. Takođe želim da mu se zahvalim na velikoj pomoći prilikom statističke analize podataka, kao i na veoma korisnim smernicama u oblasti klijanja semena.*

*Koleginici dr Slavici Dmitrović se zahvaljujem na velikoj pomoći u eksperimentalnoj fazi rada prilikom realizacije eksperimenata iz oblasti alelopatkog dejstva, takođe joj se zahvaljujem i na veoma korisnim diskusijama. Kolegi dr Branislavu Šileru ovom prilikom želim da se zahvalim na nesebičnoj pomoći prilikom završne faze uobličavanja teksta, takođe i kolegi Martinu Rasporu želim da se zahvalim na korisnim savetima i sugestijama u finalnoj fazi uobličavanja teksta.*

*Svojim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ želim ovom prilikom da se zahvalim na kolegijalnosti i pomoći, a naročito Milici Milutinović, Tijani Banjanac, Jeleni Cvetković, mr Marijani Skorić i dr Slađani Todorović na pozitivnoj energiji i podršci u trenucima kada je bilo najteže.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem dr Dragoljubu Grubišiću, koji na veliku žalost nije više sa nama. Nadam se da sam opravdala njegova očekivanja i poverenje koje mi je ukazao na početku izrade disertacije. Bilo je zadovoljstvo i čast poznavati takvog čoveka, a još veća čast blisko sarađivati sa njim.*

*I naravno, najveću zahvalnost dugujem Ivanu i Aleksi...bez njihovog razumevanja i ljubavi ne bih mogla da istrajem do kraja... Takođe, hvala mojim roditeljima i sestri kojima i posvećujem ovaj rad.*

**Antioksidativno, antimikrobno i alelopatsko dejstvo tri endemične vrste  
roda *Nepeta* (*Lamiaceae*)**

**REZIME**

*Nepeta rtanjensis* Diklić i Milojević, *N. sibirica* L. i *N. nervosa* Royle ex Bentham (fam. *Lamiaceae*) su endemične vrste roda *Nepeta*, koje su nedovoljno fitohemijski okarakterisane i slabo ispitane u pogledu biološke aktivnosti. Radi se o vrstama koje se odlikuju različitim kvalitativnim i kvantitativnim sadržajem nepetalaktona, zbog čega predstavljaju idealne objekte u istraživanjima biološke aktivnosti različitih izomera ovog monoterpenskog jedinjenja. S obzirom da se radi o retkim vrstama, a u slučaju *N. rtanjensis* i o krajnje ugroženoj vrsti, biljni materijal za potrebe eksperimenata je dobijen mikropropagacijom. Istraživanje je obuhvatilo fitohemijske analize sekundarnih metabolita tri vrste roda *Nepeta* gajenih *in vitro*, kao i analizu njihovih bioaktivnih svojstava kao što su antimikrobno, antioksidativno i alelopatsko dejstvo.

Fitohemijska karakterizacija tri vrste roda *Nepeta* gajenih *in vitro*, omogućila je identifikaciju i kvantifikaciju glavnih grupa sekundarnih metabolita (terpenoida i fenolnih jedinjenja) koji se u ovim uslovima produkuju. Metode koje su korišćene u fitohemijskim analizama su: *GC-MS*, *GC-FID*, *PTR-MS*, *Headspace GC-MS*, *HPLC-UV*, *HPLC-MS*, *UHPLC/DAD/±HESI-MS/MS*. Dominantno isparljivo jedinjenje iz grupe terpenoida je monoterpenski lakton - nepetalakton, pri čemu je kod vrste *N. rtanjensis* većinski prisutan *tran,cis*- izomer a kod *N. sibirica* *cis,trans*- izomer nepetalaktona. Kod vrste *N. nervosa* nepetalakton je detektovan samo u tragovima. Kod ispitivanih vrsta, ruzmarinska kiselina se javlja kao dominantno fenolno jedinjenje, dok su ostale fenolne kiseline (hlorogena, neohlorogena i kafeinska kiselina) prisutne u znatno nižoj koncentraciji.

Metanolni ekstrakti *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i naročito *N. nervosa*, pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost u ABTS i DPPH testovima, kao i visoki kapacitet za redukciju gvožđa u FRAP testu. Značajna antioksidativna aktivnost se pripisuje fenolnim jedinjenjima, na prvom mestu ruzmarinskoj kiselini.

Nepetalakton ne utiče značajno na antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata, ali postoji mogućnost antagonističkog delovanja između fenolnih kiselina i nepetalaktona. Metanolni ekstrakti tri vrste roda *Nepeta* pokazuju značajnu antimikrobnu aktivnost protiv osam vrsta bakterija i osam vrsta gljiva, a aktivnost potiče od monoterpenskih laktona i fenolnih jedinjenja. Najveću antimikrobnu aktivnost pokazuje metanolni ekstrakt *N. rtanjensis*, sledi *N. sibirica*, i na kraju *N. nervosa*. Stereohemija nepetalaktona bitno određuje njegovu antimikrobnu aktivnost, pri čemu je *trans,cis*-izomer aktivniji od *cis,trans*-izomera.

Potvrđeno je da vrste *N. rtanjensis* i *N. sibirica* poseduju jedinjenja koja mogu uticati na rastenje i razviće drugih biljnih vrsta u njihovom neposrednom okruženju, i na taj način aktivno učestvovati u alelopatskim interakcijama. Alelopatsko dejstvo *N. rtanjensis* i *N. sibirica* potiče od dominantnog bioaktivnog jedinjenja ovih vrsta-nepetalaktona. Stereohemija nepetalaktona značajno određuje njegov alelopatski potencijal, pri čemu *trans,cis*-izomer pokazuje veću aktivnost od *cis,trans*-izomera. Alelopatsko dejstvo nepetalaktona se ogleda kroz usporenu dinamiku klijanja semena test vrste *Lepidium sativum* L., ali i kroz efekat na biohemijske procese koji su posledica poremećenog antioksidativnog sistema biljaka. Alelopatsko dejstvo nepetalaktona, a naročito njegovog *trans,cis*-izomera, dovodi do promena u antioksidativnom sistemu klijanaca kresa narušavanjem normalnih modela ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima (POD, CAT, SOD, PPO). Primećena je inhibicija aktivnosti, kao i izmenjen profil izoformi POD, CAT, Fe-SOD i CuZn-SOD kod klijanaca kresa. *Trans,cis*-nepetalakton dovodi do povećanog sadržaja ukupnih fenola u prvim fazama rastenja i razvića klijanaca *L. sativum*, što je praćeno ranijom indukcijom ekspresije i povećanom aktivnošću PPO. Nepetalakton tokom alelopatskih interakcija indukuje određene modifikacije metabolizma sinapata kod klijanaca kresa, koje se generalno mogu opisati usporenim prevođenjem sinapoil- holina do sinapoil- glukoze, i potom do sinapoil-malata.

Alelopatska svojstva *N. rtanjensis* i *N. sibirica* ukazuju na mogućnost uspješne primene ovih vrsta i njihovih bioaktivnih komponenti u poljoprivrednoj praksi, kao bioherbicide, a u cilju suzbijanja i kontrole korovskih vrsta. U ovom radu potvrđeno je alelopatsko dejstvo *N. rtanjensis* i *N. sibirica* u slučaju poljoprivrednih kultura kao što su *L. sativum*, *Lactuca sativa* L. sorta „Majska kraljica“, *Lotus corniculatus* L. sorta „Bokor“, *Brassica napus* L., i korovskih vrsta poput *Stellaria media* (L.) Vill., *Rumex crispus* L., i *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ekotip Kolumbija.

**Ključne reči:** *Nepeta rtanjensis*, *Nepeta sibirica*, *Nepeta nervosa*, nepetalakton, fenolne kiseline, antioksidativni potencijal, antimikrobno dejstvo, alelopatija, antioksidativni enzimi

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK broj:** 581.6:582.929.4(043.3)

581.1:582.929.4(043.3)



**Antioxidative, antimicrobial and allelopathic effects of three endemic  
*Nepeta* species (*Lamiaceae*)**

**ABSTRACT**

*Nepeta rtanjensis* Diklić and Milojević, *N. sibirica* L. and *N. nervosa* Royle ex Bentham (fam. *Lamiaceae*) are endemic species of genus *Nepeta* that are insufficiently phytochemically characterized and poorly tested in a sense of their biological activity. These three species are characterized by different qualitative and quantitative nepetalactone content, what makes them ideal objects in investigating the biological activity of different stereoisomers of this compound. Considering that these species are rare, and extremely endangered in case of *N. rtanjensis*, plant material for the experiments was obtained by micropropagation. The research included phytochemical characterization of *in vitro* grown three *Nepeta* species, as well as analysis of their bioactivities such as antimicrobial, antioxidative activity and allelopathic potential.

Phytochemical characterization of three *Nepeta* species grown *in vitro*, involving GC-MS, GC-FID, PTR-MS, Headspace GC-MS, HPLC-UV, HPLC-MS, and UHPLC/DAD/±HESI-MS/MS analyses, enabled identification and quantification of the main secondary metabolites (terpenes and phenolics). The dominant volatile compound from terpenes group is monoterpene lacton - nepetalactone, whereby its *trans,cis*-isomer is mostly present in *N. rtanjensis* and its *cis,trans*- isomer in *N. sibirica*. In *N. nervosa*, nepetalactone has been detected only in traces. In all investigated species, rosmarinic acid is a dominant phenolic compound, while the other phenolic acids (chlorogenic, neochlorogenic and caffeic acids) are present in significantly lower concentrations.

The results of ABTS and DPPH assays showed that methanol extracts of *N. rtanjensis*, *N. sibirica* and especially *N. nervosa*, possess considerable antioxidant activities, and the FRAP assay revealed high ferric reducing capacity for all the samples tested.. Significant antioxidant activity is attributed to phenolic acids, in the first place to rosmarinic acid.

Nepetalactone doesn't contribute notably to the antioxidant potential of the methanol extracts, but there is a possibility of antagonistic action between phenolic acids and nepetalactone. The methanol extracts of three *Nepeta* species show significant antimicrobial activity against eight bacterial and eight fungal species, and the activity originates from monoterpenic lactones and phenolic acids. The highest antimicrobial activity was recorded for *N. rtanjensis* methanol extract, while extracts of *N. sibirica* and *N. nervosa* were less efficient. Nepetalactone stereochemistry substantially determines its antimicrobial activity, whereby the *trans,cis*- isomer is more active than the *cis,trans*- one.

It has been confirmed that *N. rtanjensis* and *N. sibirica* possess compounds that can influence growth and development of other plant species in their proximate surrounding, thus actively participating in allelopathic interactions. Allelopathic effect of *N. rtanjensis* and *N. sibirica* originates from the dominant bioactive compound of these species - nepetalactone. Stereochemistry of nepetalactone considerably determines its allelopathic potential, with *trans,cis*- isomer being more active than the *cis,trans*-nepetalactone. Allelopathic effect of nepetalactone is reflected through sluggish dynamic of seed germination in the test species *Lepidium sativum* L., but also through its effect on biochemical processes that are the consequence of plant's disturbed antioxidative system. Allelopathic effect of nepetalactone, especially of its *trans,cis*- isomer, leads to the changes in antioxidative system of cress seedlings by violating normal models of antioxidative enzymes expression and activity (POD, CAT, SOD, PPO). In cress seedlings, the inhibition of activities and changed profiles of POD, CAT, Fe-SOD and CuZn-SOD isoforms were observed. *Trans,cis*- nepetalactone action leads to the increased content of total phenols in the first phases of growth and development of *L. sativum* seedlings, which is followed by earlier induction of expression and increased PPO activity. During allelopathic interactions, nepetalactone induces certain modifications of sinapate metabolism in cress seedlings, which in general can be described by decreased conversion of sinapoylholin to sinapoylglucose, and further to sinapoylmalate.

Allelopathic features of *N. rtanjensis* and *N. sibirica* indicate the possibility of successful application of these species and their bioactive components in agricultural practice, as bioherbicides, toward weed control. In this thesis the allelopathic effect of *N. rtanjensis* and *N. sibirica* was confirmed in case of crops *L. sativum*, *Lactuca sativa* L. cv. „Majska kraljica“, *Lotus corniculatus* L. cv. „Bokor“, and *Brassica napus* L., and weeds *Stellaria media* (L.) Vill., *Rumex crispus* L., and *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Colombia.

**Key words:** *Nepeta rtanjensis*, *Nepeta sibirica*, *Nepeta nervosa*, nepetalactone, phenolic acid, antioxidative potential, antimicrobial effects, allelopathy, antioxidant enzyme

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant physiology

**UDC number:** 581.6:582.929.4(043.3)

581.1:582.929.4(043.3)

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Povezanost primarnog i sekundarnog metabolizma.....	1
1.2.	Terpenoidi.....	2
1.2.1.	Terpenoidi vrsta roda <i>Nepeta</i> .....	3
1.2.2.	Biosinteza terpenoida i nepetalaktona.....	8
1.3.	Fenolna jedinjenja.....	10
1.3.1.	Fenolne kiseline kod vrsta roda <i>Nepeta</i> .....	12
1.3.2.	Biosinteza fenolnih jedinjenja.....	13
1.3.3.	Metabolizam fenolnih jedinjenja kod vrsta familije <i>Brassicaceae</i> .....	15
1.4.	Biološka aktivnost vrsta roda <i>Nepeta</i> .....	17
1.4.1.	Antioksidativna aktivnost.....	19
1.4.1.1.	Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja.....	21
1.4.1.2.	Monoterpenoidi kao antioksidansi.....	23
1.4.1.3.	ROS kod biljaka.....	23
1.4.1.4.	Enzimske komponente antioksidativnog sistema.....	25
1.4.1.4.1.	Superoksid dismutaze (SOD).....	26
1.4.1.4.2.	Katalaze (CAT).....	27
1.4.1.4.3.	Peroksidaze (POD).....	28
1.4.1.4.4.	Polifenol oksidaze (PPO).....	29
1.4.1.4.5.	Antioksidativni enzimi vrsta fam. <i>Brassicaceae</i> .....	30
1.4.2.	Antimikrobna aktivnost.....	31
1.4.2.1.	Antimikrobna aktivnost vrsta roda <i>Nepeta</i> .....	32

1.4.3.	Alelopatija.....	33
1.4.3.1.	Monoterpenoidi kao alelohemikalije.....	34
1.4.3.2.	Alelopatski potencijal vrsta roda <i>Nepeta</i> .....	36
1.5.	Opšte odlike rtanjske metvice <i>N. rtanjensis</i> Diklić i Milojević, <i>N. sibirica</i> L. i <i>N. nervosa</i> Royle ex Bentham.....	37
1.5.1.	<i>Nepeta rtanjensis</i> Dikić i Milojević.....	37
1.5.2.	<i>Nepeta sibirica</i> L.....	39
1.5.3.	<i>Nepeta nervosa</i> Royle ex Benth.....	39
2.	CILJEVI RADA.....	40
3.	MATERIJAL I METODE.....	41
3.1.	Biljni materijal.....	41
3.1.1.	Uspostavljanje <i>in vitro</i> kulture tri vrste roda <i>Nepeta</i> .....	41
3.1.2.	<i>In vitro</i> ko-kultivacija vrste <i>Lepidium sativum</i> sa tri vrste roda <i>Nepeta</i> .....	42
3.1.3.	Ispitivanje alelopatskog potencijala etarskog ulja <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. cataria</i> , $\alpha$ -pinena i $\alpha$ -pinena.....	42
3.2.	Skenirajuća elektronska mikroskopija ( <i>SEM</i> ).....	43
3.3.	Fitohemijske analize <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> gajenih <i>in vitro</i> .....	44
3.3.1.	Analiza isparljivih jedinjenja u kulturi <i>in vitro</i> tri vrste roda <i>Nepeta</i> .....	44
3.3.1.1.	„ <i>Headspace</i> “ <i>GC-MS</i> kvalitativna analiza sadržaja isparljivih jedinjenja.....	44
3.3.1.2.	<i>PTR-MS</i> (eng. <i>Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry</i> ) kvantitativna analiza.....	45
3.3.2.	Fitohemijska karakterizacija isparljivih jedinjenja u metanolnim i dihlorometanskim ekstraktima izdanaka <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> gajenih <i>in vitro</i> .....	45

3.3.2.1.	<i>GC-MS</i> i <i>GC-FID</i> analiza metanolnih ekstrakata (Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom i gasna hromatografija sa plameno jonizujućim detektorom eng. <i>Gas Chromatography Flame Ionization Detector</i> ).....	46
3.3.2.2.	<i>GC-MS</i> analiza (Gasna hromatografija sa masenim spektrometrom eng. <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> ) dihlor-metanskih ekstrakata.....	46
3.3.2.3.	<i>HPLC-UV</i> i <i>HPLC-MS</i> analiza (Tečna hromatografija pod visokim pritiskom sa <i>UV</i> detekcijom i masenom spektrofotometrijom) sadržaja nepetalaktona u metanolnim ekstraktima.....	47
3.3.2.4.	<i>UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS</i> analiza (Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom sa <i>UV</i> detekcijom i <i>MS/MS</i> masenom spektrofotometrijom) nepetalaktona u metanolnim ekstraktima.....	47
3.3.3.	Fitohemijska karakterizacija fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima izdanaka <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> , kao i klijanaca <i>Lepidium sativum</i> gajenih <i>in vitro</i> .....	50
3.3.3.1.	Spektrofotometrijsko određivanje količine ukupnih slobodnih fenola.....	50
3.3.3.2.	Spektrofotometrijsko određivanje količine ukupnih flavonoida.....	51
3.3.3.3.	Kvalitativna i kvantitativna <i>UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS</i> i <i>UHPLC/DAD/-HESI-MS/MS</i> analiza sadržaja fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima tri vrste roda <i>Nepeta</i> i <i>L. sativum</i> .....	51
3.4.	Određivanje antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakta tri vrste <i>Nepeta</i> , etarskog ulja ( <i>N. rtanjensis</i> i <i>N. cataria</i> ), ruzmarinske i hlorogene kiseline.....	52
3.4.1.	Određivanje antioksidativne aktivnosti <i>DPPH</i> metodom.....	52
3.4.2.	<i>ABTS</i> <sup>+</sup> radikal katjon metoda.....	53
3.4.3.	$Fe^{3+}/Fe^{2+}$ redoks kapacitet ( <i>FRAP</i> ) test.....	55
3.5.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti metanolnog ekstrakta tri vrste roda <i>Nepeta</i> .....	55
3.5.1.	Priprema ekstrakta <i>Nepeta</i> .....	55
3.5.2.	Testirani mikroorganizmi.....	55

3.5.3.	Testirani antibiotici i antimikotici.....	56
3.5.4.	<i>In vitro</i> testovi za određivanje antimikrobne aktivnosti.....	56
3.5.5.	Pripremanje prekonoćne kulture bakterija.....	56
3.5.6.	Pripremanje kultura mikromiceta.....	57
3.5.7.	Metoda mikrodilucije.....	57
3.6.	Analiza antioksidativnih enzima <i>Lepidium sativum</i> .....	58
3.6.1.	Ekstrakcija ukupnih proteina.....	58
3.6.2.	Nativna elektroforeza (eng. <i>Native PAGE</i> ).....	59
3.6.2.1.	Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza (CAT).....	59
3.6.2.2.	Elektroforetska detekcija aktivnosti peroksidaza (POD).....	59
3.6.2.3.	Elektroforetska detekcija aktivnosti superoksid dismutaza (SOD).....	60
3.6.2.4.	Elektroforetska detekcija aktivnosti polifenol oksidaza(PPO).....	60
3.6.3.	Spektrofotometrijska analiza enzimske aktivnosti.....	60
3.6.3.1.	Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti ukupnih katalaza.....	60
3.6.3.2.	Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti ukupnih peroksidaza.....	61
3.6.3.3.	Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti ukupnih superoksid dismutaza.....	62
3.6.3.4.	Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti ukupnih polifenol oksidaza.....	62
3.6.4.	<i>SDS-PAGE</i> elektroforeza i imunodetekcija proteina (eng. <i>Immuno blotting</i> ).....	63
3.6.4.1.	Primarna antitela.....	64
3.6.4.2.	Sekundarna antitela.....	64
3.7.	Statistička analiza podataka.....	65

4. REZULTATI.....	66
4.1. <i>In vitro</i> kultura tri vrste roda <i>Nepeta</i> .....	66
4.2. Analiza žlezdanih struktura površine lista tri vrste roda <i>Nepeta</i> .....	66
4.3. Fitohemijske analize <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> gajenih <i>in vitro</i> .....	67
4.3.1. Analiza isparljivih jedinjenja u kulturi <i>in vitro</i> <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> .....	67
4.3.1.1. <i>Headspace GC-MS</i> analiza.....	67
4.3.1.2. <i>PTR-MS</i> analiza.....	71
4.3.2. Fitohemijaska karakterizacija metanolnih i dihlor-metanskih ekstrakata <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> .....	72
4.3.2.1. <i>GC-MS</i> analiza dihlor-metanskih ekstrakata <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> .....	72
4.3.2.2. <i>GC-MS</i> i <i>GC-FID</i> analiza metanolnih ekstrakata <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> .....	74
4.3.2.3. <i>HPLC-DAD</i> i analiza metanolnih ekstrakata <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> .....	75
4.3.2.4. <i>UHPLC/DAD/HESI-MS/MS</i> analiza metanolnih ekstrakata <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> .....	77
4.3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida u metanolnim ekstraktima <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> .....	84
4.4. Antioksidativna aktivnost.....	85
4.4.1. Antioksidativna aktivnost ispitivana <i>DPPH</i> metodom.....	85
4.4.2. Sposobnost neutralizacije <i>ABTS</i> <sup>+</sup> radikal katjona.....	87
4.4.3. $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ redoks kapacitet ( <i>FRAP</i> ) test.....	88
4.5. Antimikrobno dejstvo.....	88
4.6. Uticaj isparljivih jedinjenja tri vrste roda <i>Nepeta</i> sp. na klijanje i rast test vrste <i>Lepidium sativum</i> L. (kres).....	91
4.6.1. Analiza antioksidativnih enzima <i>Lepidium sativum</i> .....	96
4.6.1.1. Elektroforetska i spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti superoksid dismutaza ( <i>SOD</i> ) i imunoblot analiza.....	96



4.6.1.2.	Elektroforetska detekcija i spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti katalaza (CAT).....	102
4.6.1.3.	Elektroforetska i spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti peroksidaza (POD).....	105
4.6.1.4.	Polifenol oksidaze (PPO): elektroforetska detekcija, spektrofotometrijska aktivnost i imunoblot analiza.....	108
4.6.2.	Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima klijanaca <i>L. sativum</i> .....	110
4.6.2.1.	<i>UHPLC-DAD/HESI-MS/MS</i> karakterizacija metanolnih ekstrakata <i>Lepidium sativum</i> .....	111
4.6.3.	Ispitivanje alelopatskog efekta <i>trans,cis</i> -nepetalaktona, <i>cis,trans</i> -nepetalaktona, $\alpha$ -pinena i $\alpha$ -pinena na klijanje odabranih poljoprivrednih kultura i korovskih vrsta.....	116
5.	DISKUSIJA.....	125
5.1.	Antioksidativna aktivnost <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> .....	130
5.2.	Antimikrobna aktivnost <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> .....	134
5.3.	Alelopatsko dejstvo <i>N. rtanjensis</i> , <i>N. sibirica</i> i <i>N. nervosa</i> .....	139
6.	ZAKLJUČCI.....	161
7.	LITERATURA.....	165
	BIOGRAFIJA AUTORA.....	218
	Prilog 1 - Izjava o autorstvu doktorskog rada	
	Prilog 2 - Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
	Prilog 3 - Izjava o korišćenju doktorskog rada	

## SKRAĆENICE

APOD - askorbat peroksidaze

BHA - butilovani hidroksianisolen

BHT - butilovani hidroksitoluen

C3H - 4-kumaratestar 3- hidroksilaza

C4H- cinamat-4-hidroksilaza

CAH - cinamat-4-hidroksilaza

CAT - katalaze

CCoAOMT - koniferil-CoA o-metiltransferaza

CCR - cinamoil-CoA reduktaza

4CL - hidroksicinamat: CoA-ligaza

4CL - 4-kumarat: CoA ligaza

COMT - kafeoil O-metiltransferaza

DHAR - dehidroaskorbat reduktaze

DMAPP - dimetilalil difosfat

F5H - ferulat 5-hidroksilaza

FPP - farnezil difosfat

FPS - farnezildifosfat sintaza

GC-FID - gasna hromatografija sa plameno jonizujućim detektorom

GC-MS - gasna hromatografija sa masenom spektrometijom

GGPP - geranilgeranil difosfat

GGPS - geranilgeranil difosfat sintaza

GPOD - gvajakol peroksidaze

GPP - geranil difosfat

GPS - geranil difosfat sintaza

GR - glutation reduktaze

GST - glutation transferaze

HCT - hidroksicinamoil transferaza

HK - hlorogena kiselina

HPPR - hidroksifenilpiruvat reduktaza

IPP - izopentenil difosfat

KGT - kapitatne glandularne trihome

KK - kafeinska kiselina

MBC - minimalna baktericidna koncentracija

MDHAR - monodehidroaskorbat reduktaze

MEP - metileritritol fosfatni biosintetski put

MFC - minimalna fungicidna koncentracija

MIC - minimalna inhibitorna koncentracija

MTOV - mehaničke trihome sa zaobljenim vrhom

MTZV - mehaničke trihome sa zašiljenim vrhom

MVA - mevalonatni biosintetski put

PAL - fenilalanin amonijum lijaza

PAL - fenilalanin-amonijum liaza

PEP - fosfoenolpiruvat

PGT - peltatne glandularne trihome

PPO - polifenol oksidaze

PSII - fotosistem II

RAS - hidroksicinamoil-CoA: hidroksifenilacetathidroksicinamoil transferaza

RK - ruzmarinska kiselina

ROS - reaktivne vrste kiseonika

SALDH/CALDH- sinapaldehid/koniferaldehid dehidrogenaza

SCE- sinapin esteraza

SCT- sinapoilglukoza: malat sinapoiltransferaza

SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija

SGT - sinapat glukoziltransferaza

SMT - sinapoilglukoza: malatsinapolitransferaza

SOD - superoksid dismutaze

TAT - tirozin aminotransferaza

TPS - terpenske sintaze

## 1. UVOD

### 1.1. Povezanost primarnog i sekundarnog metabolizma

Metabolizam je širok pojam koji obuhvata sintezu, degradaciju i sve biohemijske transformacije organskih jedinjenja, koje se dešavaju u živom organizmu. Svim živim bićima je za održavanje života, kao i za rasteenje i razviće, potrebna energija, ali ne energija u bilo kom obliku, nego samo ona koja potiče od organskih hemijskih jedinjenja. Jedinjenja kao što su šećeri, aminokiseline, masne kiseline, nukleotidi kao i polimeri koji nastaju iz pomenutih molekula deo su primarnog metabolizma i predstavljaju primarne metabolite (*Nešković i sar., 2003*).

Sa druge strane postoji i područje metaboličkih procesa preko kojih se sintetišu jedinjenja koja na prvi pogled nemaju očiglednu funkciju u biljnom organizmu. Ovakvi procesi čine sekundarni metabolizam a jedinjenja koja su proistekla iz njih nazivaju se sekundarni metaboliti. Međutim, ne može se napraviti jasna granica između primarnog i sekundarnog metabolizma, sa obzirom da su ova dva tipa metabolizma međusobno povezana. (*Fridman i Pichersky, 2005, Besseau i sar., 2007, Böttcher i sar., 2008*). Okarakterisan je veliki broj enzima koji su uključeni u sekundarni metabolizam biljaka, a čiji homolozi su prepoznati i funkcionišu i u primarnom metabolizmu (*Ober i Hartmann 1999, Steffens, 2000*). Dugo se verovalo da su sekundarni metaboliti samo sporedni produkti bez esencijalnog značaja za biljke. Danas je poznato da su ova jedinjenja sastavni delovi nekih enzimskih sistema, poseduju hormonsku aktivnost, imaju zaštitnu ulogu u biljkama, alelopatsku i repelentnu funkciju. Takođe, proizvodi sekundarnog metabolizma danas predstavljaju važan izvor farmakološki važnih jedinjenja (*Paré i sar., 1985, Dudareve i sar., 2004*). Na osnovu brojnih opisanih uloga sekundarnih metabolita, kako u biljkama, tako i u ljudskom organizmu, sekundarni metaboliti se često označavaju kao bioaktivna jedinjenja. Bioaktivna jedinjenja se mogu definisati i kao nenutritivni sastojci biljaka koji se obično javljaju u veoma malim količinama. Poznato je na hiljade bioaktivnih jedinjenja koja najčešće pripadaju klasama alkaloida, heterozida, saponoida, polifenola, steroida i terpenoida.

## 1.2. Terpenoidi

Terpenoidi predstavljaju jednu od najvećih klasa prirodnih proizvoda. Iz različitih biljaka i mikroorganizama do sada je izolovano preko 25 000 terpenoida (*Baser i Demirci, 2007*). Terpenoidi su jedinjenja koja su izgrađena od izoprena (5 C atoma), i upravo zbog toga se često nazivaju i izoprenoidi. Na osnovu broja ugljenikovih atoma, odnosno broja izoprenskih jedinica od kojih su izgrađeni, terpenoidi se mogu podeliti na monoterpenoide (10 C atoma, dve izoprenske jedinice), seskviterpenoide (15 C atoma, tri izoprenske jedinice), diterpenoide (20 C atoma, četiri izoprenske jedinice), triterpenoide (30 C atoma, šest izoprenskih jedinica), tetraterpenoide (40 C atoma, osam izoprenskih jedinica) i politerpenoide (>40C atoma, >8 izoprenskih jedinica) (*Mahmoud i Croteau, 2002*). Terpenoidi su jedinjenja koja su odgovorna za karakteristični miris biljka, pri čemu se u isparljive terpenoide svrstavaju monoterpenoidi i seskviterpenoidi.

Monoterpenoidi su jedinjenja koja predstavljaju glavne komponente etarskih ulja velikog broja aromatičnih biljnih vrsta. Do sada je izolovano i okarakterisano više od 1500 jedinjenja ove grupe. Izgrađeni su od dve izoprenske jedinice, a strukturna raznovrsnost monoterpenoida je rezultat različitog načina povezivanja osnovnih gradivnih jedinica, intramolekulskog premeštanja i sekundarne ciklizacije. Prema najjednostavnijem sistemu klasifikacije monoterpenoidi se dele na: aciklične (dve izoprenske jedinice povezane su po principu glava – rep, i smatra se da su derivati 2,6-dimetiloktana) i ciklične (po veličini prstena mogu biti monociklični, biciklični i triciklični). Takođe, postoji i šira klasifikacija prema kojoj se monoterpenoidi mogu podeliti na osnovu funkcionalne grupe na alkohole, ketone, estre i druge (*Buckinghamman, 1994*). Posebnu grupu monoterpenoida čine iridoidi, koji se u prirodi najčešće nalaze kao neisparljiva jedinjenja, vezana u obliku glikozida.

Preciznu ulogu monoterpenoida je teško definisati, ali se zna da učestvuju kao posrednici u mnogobrojnim interakcijama u prirodi, učestvuju u privlačenju oprašivača, štite biljku od napada patogenih mikroorganizama i od napada insekata, a imaju i važnu ulogu u „komunikaciji“ između biljaka (Croteau i sar., 2000). Pored mnogobrojnih ekoloških uloga, monoterpenoidi se intenzivno koriste i u industriji hrane, kozmetike, kao i u farmaceutskoj industriji (Mahmoud i Croteau, 2002).

Seskviterpenoidi su jedinjenja izgrađena od tri izoprenske jedinice i predstavljaju veoma raznoliku grupu terpenoida. U biljkama imaju ulogu feromona i juvenilnih hormona. Kao i monoterpenoidi, dele se na aciklične i ciklične. Aciklični predstavnici seskviterpenoida se često nazivaju i farnezani, pošto nastaju od farnesola (Graßmann, 2005). Na osnovu veličine prstena razlikujemo monociklične (bisaboleni, germakreni, elemenini, humuleni i drugi) i policiklične seskviterpene (kariofileni, eudezmani, akorani, kamferani, kedrani, drimani, kadinani, oplopani, gvajani) (Aharoni i sar., 2005, Zwenger i Basu, 2008, Civjan, 2012).

Diterpenoidi su velika grupa strukturno veoma različitih jedinjenja, i u prirodi se najčešće javljaju kao diciklična, triciklična i tetraciklična jedinjenja. Diterpenoidi u biljkama imaju važne ekološke i fiziološke funkcije: diterpenoid fitol je strukturni segment hlorofila, dok fitoaleksini predstavljaju prirodni odbrambeni mehanizam biljaka u zaštiti od patogenih mikroorganizama i predatora (Dewick, 2002).

Triterpenoidi se sastoje iz dve farnezanske jedinice povezane po principu glava-rep. Triterpenoidi nisu uobičajeni sastojci etarskih ulja. Glavne grupe ovih jedinjenja koje se javljaju u prirodi su saponini, glikozidi, fitosteroli, steroidi. (Sawai i Saito, 2011, Civjan, 2012).

### **1.2.1. Terpenoidi vrsta roda *Nepeta***

Najnoviji sistem klasifikacije na osnovu hemijskih karaktera u okviru familije *Lamiaceae* daje Takhtajan (2009). Po njemu su vrste familije *Lamiaceae* podeljene u dve grupe: A) vrste koje su siromašne etarskim uljima i kod kojih ruzmarinska kiselina nije prisutna, ali sadrže iridoidne glukozide, dok ulje u semenima sadrži umereno nezasićene masne kiseline (*Caryopteridoideae*, *Ajugoideae*, *Chloantoideae*, *Wenchengioideae*, *Scutellarioideae* i *Lamioideae*);

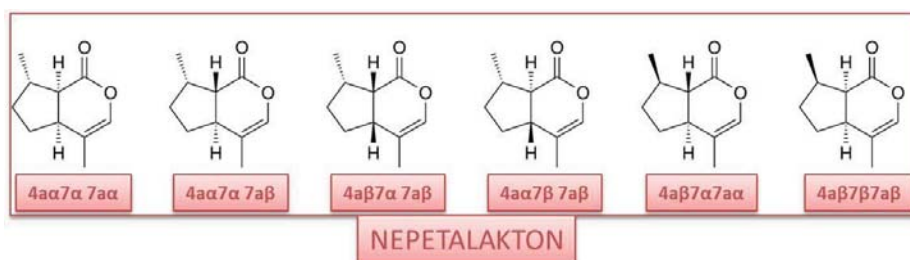
B) vrste koje su bogate etarskim uljima i sadrže ruzmarinsku kiselinu ali ne sadrže iridoidne glikozide, dok ulje u semenima sadrži jako nezasićene masne kiseline. U drugu grupu se ubrajaju samo vrste podfamilije *Nepetoideae*. Podfamiliju *Nepetoideae*, tribus *Nepeteae*, čine vrste roda *Nepeta*, koje se takođe dele u dve grupe na osnovu prisustva ili odsustva hemotaksonomskog markera nepetalaktona. Kod najvećeg broja vrsta roda *Nepeta*, prisutan je neki od diastereoizomera nepetalaktona. Ovaj iridiodni monoterpenski lakton, za razliku od uobičajenih iridoida, nije vezan u obliku glikozida i veoma je isparljiv. Međutim, određeni broj vrsta ne poseduje ovo jedinjenje. U Tabeli 1 je dat pregled kvalitativnog sadržaja nepetalaktona u etarskom ulju vrsta roda *Nepeta* koje su fitohemijski okarakterisane GC-MS analizama. Značajno je napomenuti da su pored stereoizomera nepetalaktona, iz vrsta roda *Nepeta* izolovana i druga jedinjenja koja su slična nepetalaktonima:  $\alpha$ - i  $\beta$ -dihidronepetalakton,  $\delta$ - i  $\gamma$ -dihidronepetalakton (Regnier i sar., 1967, Kalpoutzakis i sar., 2001, Heuskin i sar., 2009), nepetalinska kiselina (McElvain, 1955) i mnoga druga.

Prva fitohemijska analiza vrsta roda *Nepeta* urađena je 1955. godine (McElvain i sar., 1955). Od tada pa do danas, kod vrsta ovog roda potvrđeno je prisustvo različitih tipova sekundarnih metabolita kao što su monoterpenski, seskviterpenski, diterpenski, triterpenski, flavonoidi, fenolna jedinjenja, itd. Do 2010. godine identifikovana su ukupno 193 jedinjenja kod različitih vrsta ovog roda, među kojima terpenoidi predstavljaju dominantnu grupu jedinjenja (Formisano i sar., 2011).

Nepetalakton ( $C_9H_{14}O_2$ ) je izgrađen od ciklopentanoidnog prstena i cikličnog estera. Nepetalaktoni mogu postojati u obliku osam stereoizomera, četiri diastereoizomera i njihovih odgovarajućih enantiomera (Liblikas i sar., 2005). Prvi metil-ciklopentanoidni monoterpenski koji je u potpunosti okarakterisan je  $4\alpha,7\alpha,7\alpha$ -nepetalakton (*cis,trans* izomer nepetalaktona), a izolovan je iz etarskog ulja *N. cataria* (Bates i sar., 1958, Regnier i sar., 1967, DePooter i sar., 1987) (Slika 1). Epimer  $4\alpha,7\alpha,7\alpha$ -nepetalaktona je  $4\alpha,7\alpha,7\alpha\beta$ -nepetalakton (*trans,cis*-nepetalakton) i takođe je prvi put izolovan iz etarskog ulja *N. cataria* (Bellesia i sar., 1979, Einsenbraun i sar., 1981).



Treći diastereoizomer nepetalaktona koji je izolovan iz etarskog ulja *N. mussinii* je *cis,cis*-nepetalakton (4 $\alpha$  $\beta$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$  $\beta$ ) (Regnier i sar., 1967), dok je 4 $\alpha\alpha$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha$  $\beta$ -stereoizomer nepetalaktona prvi put okarakterisan kod vrste *N. elliptica* (Bottini i sar., 1987). DePooter i saradnici su 1987. godine prvi put detektovali *trans,trans*-nepetalakton (4 $\alpha$  $\beta$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha\alpha$ ) kod vrste *N. nuda*. Stereoizomeri nepetalaktona koji do danas nisu izolovani iz prirodnih izvora, a teoretski mogu da postoje su 4 $\alpha$  $\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha$  $\beta$ -nepetalakton i njegov enantiomer 4 $\alpha$  $\beta$ ,7 $\beta$ ,7 $\alpha\alpha$ -nepetalakton. Inerentno je da su jedino 7S diastereoizomeri pronađeni u prirodnim uslovima, kao i to da se izomeri nepetalaktona razlikuju u orijentaciji samo jedne hemijske veze, a pokazuju potpuno različitu biološku aktivnost (Liblikas i sar., 2005).



**Slika 1.** Stereoizomeri nepetalaktona

**Tabela 1.** Saržaj nepetalaktona (%) u etarskom ulju različitih vrsta roda *Nepeta*. Rezultati dobijeni upotrebom metode gasne hromatografije sa masenom spektroskopijom (CG-MS).

Vrsta	4 $\alpha\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha\alpha$	4 $\alpha\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ $\beta$	4 $\alpha$ $\beta$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ $\beta$	4 $\alpha$ $\beta$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha\alpha$	Reference
<i>N. argolica</i> Bory i Chaub. ssp. <i>argolica</i>	0-26,52	0-12,93	0,38-15,45	1,93-29,38	Skaltsa i sar. 2000.
<i>N. atlantica</i> Ball.	-	71,4	-	-	Zenasni i sar. 2008.
<i>N. asterotrichus</i> Rech. F. i Aell.	-	-	14,8	-	Rustaiyan i sar. 1999.
<i>N. binaludensis</i> Jamzad	25,2	-	-	0,7	Rustaiyan i Najadi 1999.
<i>N. betonicifolia</i> C.A. Meyer	-	-	-	-	Baser i sar. 2001.
<i>N. bornmuelleri</i> Hausskn. ex Bornm.	-	-	64	-	Sefidkon i Jamzad, 2007.

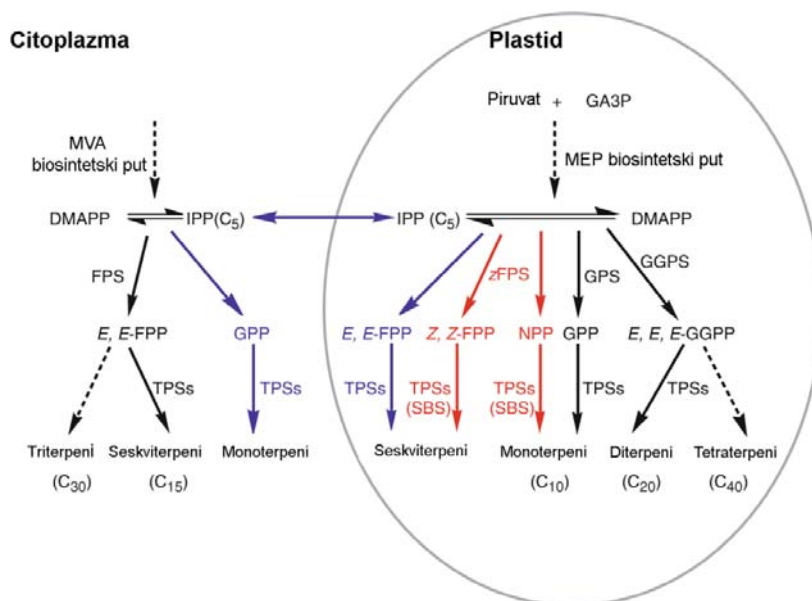
<i>N. bracteata</i> Benth.	-	-	-	-	Sefidkon i Jamzad, 2007.
<i>N. cadmea</i> Boiss.	81,6	-	-	-	Celik i sar. 2008.
<i>N. caesarea</i> Boiss.	92-95	-	-	-	Aydin i sar. 1998.
<i>N. cataria</i> L.	89,0	-	-	-	Handijeva i sar. 1996.
<i>N. cataria</i> L.	60-99	1-40	t	-	Lawrence, 1992.
<i>N. cataria</i> L.	70,1-91,1	0,1-20	1	t-0,1	Regnier i sar. 1967.
<i>N. cataria</i> L.	10,6-94,1	0,4-65,2	0,1-0,2	-	DePooter i sar. 1988.
<i>N. crassifolia</i> Boiss. i Bushe.	92,5		0,64		Dabiri i Sefidkon, 2003b.
<i>N. crispa</i> Willd.	-	20,3	1,9	-	Sonboli i sar. 2004.
<i>N. cephalotes</i> Boiss.	35,1	-	-	-	Rustaiyan i sar. 2000.
<i>N. congesta</i> Fisch. i Mey. ssp. <i>congesta</i>	-	-	-	-	Kaya i sar. 2007.
<i>N. curviflora</i> Boiss.	-	-	-	-	Senatore i sar. 2005.
<i>N. cilicia</i> Boiss.	-	-	-	-	Karaman i sar. 2007.
<i>N. depauperata</i> Benth.	-	-	-	-	Mehrabani i sar. 2004.
<i>N. denudate</i> Benth.	-	-	-	-	Rustaiyan i sar. 2000.
<i>N. discolor</i> Benth.	-	-	-	-	Mathela i sar. 1994.
<i>N. daenensis</i> Boiss.	-	-	-	-	Sajjadi i Mehregan, 2005.
<i>Nepeta eremophila</i> Hausskn. i Bornm	2,6	2,6	73,3	-	Sefidkon i sar. 2006.
<i>N. elymatica</i> Bornm.	-	-	-	35,6	Nori-Shargha i Baharvand, 2005.
<i>N. faassenii</i> Bergmans ex Stearn	67,8	-	2,3	-	Radulović i sar. 2011.
<i>N. flavida</i> Hub.-Mor.	-	-	-	-	Tepe i sar. 2007
<i>N. fissa</i> C.A.Mey.	-	-	-	-	Sefidkon i sar. 2002.
<i>N. gloeocephala</i> Rech.	-	-	-	-	Safaei-Ghomi i sar. 2006.
<i>N. grandiflora</i> L.	1,3-1,9	-	-	-	Handijeva i sar. 1996.
<i>Nepeta glomerulosa</i> Boiss. ssp. <i>carmanica</i>	-	-	-	-	Sajjadi i Ghassemi, 1999.
<i>N. ispahanica</i> Boiss.	-	2,6	0,6	0,3	Sefidkon i sar. 2006
<i>N. italica</i> L.	-	-	-	-	Kökdil i sar. 1997.
<i>N. heliotropifolia</i> Lam.	-	-	-	-	Sajjadi i Khatamsaz, 2001.
<i>N. kotschyi</i> Boiss.	-	-	-	92	Nori-Shargh i sar. 2006.
<i>N. macrosiphon</i> Boiss	-	-	-	-	Javidnia i sar. 2004.

<i>N. meyeri</i> Benth.		53,2	-	-	-	<i>Sefidkon</i> i <i>Shaabani</i> , 2004.
<i>N. meyeri</i> Benth.	-	68,1	-	-	-	<i>Esmaili</i> i sar. 2006.
<i>N. mahanensis</i> Jamzad i Simmonds	-	37,6	-	-	-	<i>Sefidkon</i> i sar. 2005.
<i>N. makuensis</i> Jam. i Mozaf.	-	-	-	-	-	<i>Habilia</i> i sar. 2004.
<i>N. mirzayanii</i> Rech. i Esfand.	61	-	-	-	-	<i>Sefidkon</i> i <i>Jamazd</i> , 2007.
<i>N. menthoides</i> Boiss i Buhse	23,3	-	-	-	-	<i>Sonboli</i> i sar. 2009.
<i>N. nepetalla</i> L.	76,5-89,5	0,4-0,6	-	-	-	<i>Lawrence</i> , 1992
<i>N. nervosa</i> Royle ex Benth.	0,5	-	-	-	-	<i>Lawrence</i> , 1992.
<i>N. nuda</i> L. ssp. <i>albiflora</i> (Boiss.)	37,5	37,6	-	-	-	<i>Kökdil</i> i sar. 1996.
<i>N. nuda</i> L. ssp. <i>nuda</i>	-	-	-	-	-	<i>Kökdil</i> i sar. 1998.
<i>N. pannonica</i> L.	15	11,5	-	-	-	<i>Lawrence</i> , 1992.
<i>N. parnassica</i> Heldr. i Sart	17,3	8,9-22,0	7,9	-	-	<i>Gkinis</i> i sar. 2003.
<i>N. persica</i> Boiss.	80	-	-	-	-	<i>Mahboubi</i> i sar. 2011.
<i>N. podostachys</i> Benth.	0,2	-	-	-	-	<i>Lawrence</i> , 1992.
<i>N. pogonosperma</i> Jamzad i Assadi	-	57,6	-	-	-	<i>Sefidkon</i> i sar. 2003.
<i>N. pilinix</i> P. H. Davis	66,7	-	-	-	-	<i>Baser</i> i sar. 2000.
<i>N. racemosa</i> Lam.	24,4	25,6	33,6	-	-	<i>Dabiri</i> i <i>Sefidkon</i> , 2003a.
<i>N. rivularis</i> Bornm.	2,4	1,9	-	-	-	<i>Sefidkon</i> i sar. 2006
<i>N. raphanorhiza</i> Benth.	-	-	-	-	-	<i>Rather</i> i sar. 2012.
<i>N. rtanjensis</i> Diklić i Milojević	-	86,4	0,9	-	-	<i>Chalchar</i> i sar.. 2000.
<i>N. sibirica</i> L.	84,7	1,6	-	-	-	<i>Letchamo</i> i sar. 2005
<i>N. satureioides</i> Boiss.	-	-	-	-	-	<i>Hadian</i> i sar. 2006.
<i>N. sintenisii</i> Bornm.	-	1,6	23,4	-	-	<i>Sajjadi</i> , 2005.
<i>N. sulfuriflora</i> P. H. Davis	0,5	-	-	-	-	<i>Kökdil</i> i sar. 1997.
<i>N. teydea</i> Webb i Benth.	1,4-89,5	0-0,4	0-1,5	0-0,1	-	<i>Lawrence</i> , 1992
<i>N. tuberosa</i> L. ssp. <i>reticulata</i> (Desf.) Maire	t	76,8	-	-	-	<i>Zenasni</i> i sar. 2008.
<i>N. ucrainica</i> L. ssp. <i>kopetdaghensis</i>	-	-	-	-	-	<i>Javidnia</i> i sar. 2005.

Kod vrsta roda *Nepeta* koje ne poseduju nepetalaktone, etarska ulja sadrže neka od sledećih monoterpenoida:  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, 1,4-cineol, 1,8-cineol (*Sajjadi i Eskandari, 2005*), iridodial  $\beta$ -monoeol acetat, dihidroiridodial acetat, iridodial dienol diacetat (*Bottini i sar., 1992, Saxena i Mathela, 1996*), aktinidin (*Saxsena i Mathela 1996*), argolinsku kiselinu ili metil estre argolinske kiseline (*Ahmed i sar., 2006*),  $\alpha$ -kopaen (*Gkinis, 2003*). Od seskviterpenoida prisutni su germakren D (*Zamfirache i sar., 2010*), kadinen (*Bozari, 2012*), farnesen (*Sajjadi, 2005*), a od diterpenoida parnapimarol (*Gkinis i sar., 2008*), krasifol (*Ibrahim i sar., 2007*) kao i dimeri nepetalaktona - diterpenoidi nepetanudon i nepetaparnon (*Kokdil i sar., 1998*).

### 1.2.2. Biosinteza terpenoida i nepetalaktona

Svi terpenoidi nastaju kombinacijom iz dva prekursora: izopentenil difosfata (IPP) i njegovog izomera dimetilalil difosfata (DMAPP) (Slika 2). IPP nastaje u plastidima iz gliceraldehid-3-fosfata i piruvata, dok u citoplazmi iz acetyl-CoA nastaje IPP koji izomerizacijom prelazi u DMAPP, u reakciji koju katalizuje enzim IPP izomeraza. Sami prekursori vode poreklo iz jednog od dva biosintetička puta: citoplazmatičnog mevalonatnog (MVA) puta i plastidnog metileritritol fosfatnog puta (MEP). Iz početnih molekula dejstvom enzima geranil-difosfat sintaze (GPS), farnezil-difosfat sintaze (FPS) i geranilgeranil-difosfat sintaze (GGPS), nastaju geranil difosfat (GPP), farnezil difosfat (FPP) i geranilgeranil difosfat (GGPP). Ovi intermedijeri predstavljaju ključne tačke grananja izoprenoidnog metabolizma, odakle delovanjem terpenskih sintaza (TPS), iz GPP kao supstrata nastaju monoterpenoidi, iz FPP se dalje sintetišu seskviterpenoidi, dok iz GGPP nastaju diterpenoidi. U višim biljkama se odvijaju oba biosintetička puta izoprenoidnog metabolizma. MVA biosintetski put je lokalizovan u citoplazmi i odgovoran je za sintezu većine seskviterpena ( $C_{15}$ ) i triterpena ( $C_{30}$ ), dok se sinteza monoterpenoida ( $C_{10}$ ), diterpenoida ( $C_{20}$ ) i tetraterpenoida ( $C_{40}$ ) odvija u plastidima preko MEP puta (*Yu i Utsumi, 2009*).

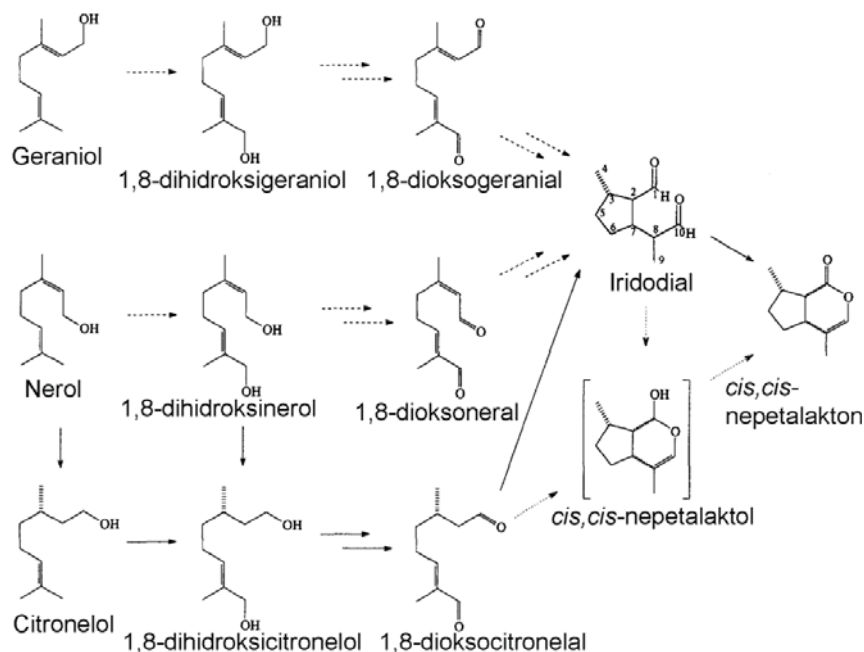


**Slika 2.** Biosintetski put terpenoida u višim biljkama. Skraćenice: **MVA** mevalonatni biosintetski put ograničen na citosol, **MEP** metileritritol fosfatni put ograničen na plastide. **IPP** izopentenil difosfat, **DMAPP** dimetilalil difosfat, **GPP** geranil difosfat, ***E,E*-FPP** farnezil difosfat, ***E,E,E*-GGPP** geranilgeranil difosfat, **GPS** geranil difosfat sintaza, **FPS** farnezildifosfat sintaza, **GGPS** geranilgeranil difosfat sintaza. Predstavljena shema je modifikovana prema Yu i Utsumi, 2009.

Biosintetski put koji vodi ka sintezi nepetalaktona do danas nije rasvetljen. Kao mogući intermedijeri konverzije GPP u nepetalakton pominju se monoterpeni alkoholi geraniol (Clark i sar., 1997), nerol i citronelol (Bellesia i sar., 1984, Hallahan i sar., 1998). Mogući put biosinteze nepetalaktona pretpostavlja hidroksilaciju geraniola, nerola ili citronelola membranskim enzimom iz grupe citohrom P450 oksigenaza (Inouye, 1991, Hallahan i sar., 1995) (Slika 3). Kod nekih vrsta hidroksigeraniol i hidroksinerol učestvuju u formiranju loganina (Escher i sar., 1970), dok se pretpostavlja da hidroksicitronelol učestvuje u formiranju nepetalaktona.

Oksidaciju hidroksilovanih intermedijera katalizuje enzim  $\text{NADP}^+$  zavisna oksidoreduktaza (Ikeda i sar., 1991, Hallahan i sar., 1995). Ciklaze, koje učestvuju u prevođenju acikličnih monoterpenih aldehida u metilciklopentansku strukturu, delimično su okarakterisane od strane Uesato i saradnika (1991). Takođe je okarakterisan enzim nepetalaktol oksidaza koja prevodi nepetalaktol do nepetalaktona.

Prisustvo ovog enzima kod vrste *Nepeta racemosa* navodi na pretpostavku da put biosinteze nepetalaktona ide preko citronelola. Nepetalaktol oksidaza je pronađena u ekstraktima peltatnih glandularnih trihoma, što ukazuje na to da je ovaj tip žlezdanih dlaka mesto akumulacije i sinteze nepetalaktona (Hallahan i sar., 1998).



**Slika 3.** Pretpostavljeni put biosinteze nepetalaktona od geraniola, nerola ili citronelola. Predstavljena shema je modifikovana prema Hallahan i sar., 1998.

### 1.3. Fenolna jedinjenja

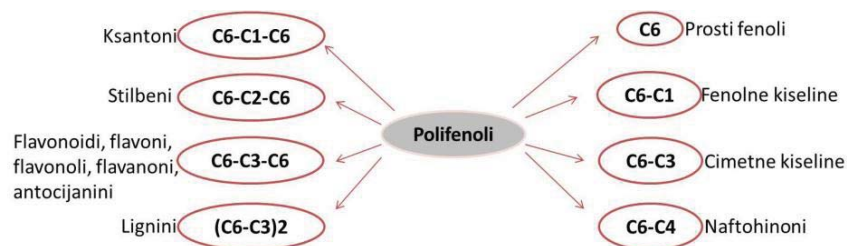
Fenolna jedinjenja čine najrasprostranjeniju grupu sekundarnih metabolita, koji se zbog svojih antioksidativnih osobina upotrebljavaju u medicini, farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Martin i Appel, 2010). Fenolna jedinjenja u svom sastavu imaju bar jedan aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa (Stalikas, 2007). Jedna od najčešće pominjanih i najčešće ispitivanih osobina fenolnih jedinjenja je njihova antioksidativna aktivnost.

Smatra se da je izražena antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja rezultat sposobnosti fenolnih jedinjenja da budu donori vodonikovih atoma i da pri tome uklanjaju slobodne radikale, uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala (Pietta, 2000).

Formirani radikali su stabilniji zbog delokalizacije elektrona i postojanja više rezonantnih formi. Postoje različite klasifikacije fenola. Na Slici 4 je predstavljena klasifikacija fenolnih jedinjenja na osnovu broja konstitutivnih ugljenikovih atoma osnovnog skeleta fenola. Prema ovoj podeli postoje: prosti fenoli, fenolne kiseline, cimetne kiseline, naftohinoni, ksantoni, stilbeni, flavonoidi i lignini (Boros i sar., 2010).

Fenolne kiseline se mogu podeliti u dve grupe: kiseline koje su derivati benzoeve kiseline i one koje su derivati cimetne kiseline (Robbins, 2003). Najzastupljeniji derivati hidroksibenzoeve kiseline su vanilinska, galna, elaginska, protokatehinska, siringinska i gentisinska kiselina. Derivati cimetne kiseline su zastupljeniji u prirodi i obuhvataju kumarinsku, kafeinsku, ruzmarinsku, ferulinsku, sinapinsku i hlorogenu kiselinu.

Scarpati i Oriente (1958) su prvi put izolovali ruzmarinsku kiselinu iz vrste *Rosmarinus officinalis*, po kojoj je ova fenolna kiselina i dobila naziv. Ruzmarinska kiselina u osnovi predstavlja estar kafeinske kiseline i 3,4-dihidroksifenil mlečne kiseline (Scarpati i Oriente, 1958). U prirodi postoji veliki broj derivata ruzmarinske kiseline koji se sastoje iz jednog ili više molekula ruzmarinske kiseline, povezanih sa drugim aromatičnim ili alifatičnim strukturama. Najpoznatiji derivati ruzmarinske kiseline su litosperminska kiselina A, koja predstavlja estar ruzmarinske i kafeinske kiseline, i litosperminska kiselina B koja je dimer ruzmarinske kiseline (Kelley i sar., 1975, Tanaka i sar., 1989). Ruzmarinska kiselina ima brojne biološke aktivnosti, kao što su: antioksidativna (Laguerre i sar., 2008, Exarchou i sar., 2002), antiinflamatorna (Osakabe i sar., 2004), antivirusna (Swarup i sar., 2007), antimutagena, antibakterijska, antikancerogena (D'Amelio, 1999, Erkan i sar, 2008), itd.



**Slika 4.** Klasifikacija fenolnih jedinjenja na osnovu broja konstitutivnih ugljenikovih atoma osnovnog skeleta fenola. Predstavljena shema je modifikovana prema Boros i sar., 2010.

### 1.3.1. Fenolne kiseline kod vrsta roda *Nepeta*

Aromatične biljke predstavljaju značajan izvor fenolnih jedinjenja. Neke biljne familije su posebno bogate fenolnim jedinjenjima. Tu spadaju familije *Lamiaceae* (Scarpati i Oriente, 1958), *Boraginaceae* (Kelley i sar 1975), *Apiaceae* (Hiller, 1965), *Araliaceae* (Trute i Nahrstedt 1996), *Cucurbitaceae* (De Tommasi, 1991) i *Tiliaceae* (Lasure i sar., 1994). U okviru familije *Lamiaceae* najzastupljenije fenolne kiseline su ruzmarinska i kafeinska kiselina (Litvinenko i sar., 1975), s tim što je zastupljenost ruzmarinske kiseline ograničena na podfamiliju *Nepetoideae*. Neke od identifikovanih fenolnih kiselina kod vrsta roda *Nepeta* prikazane su u Tabeli 2.

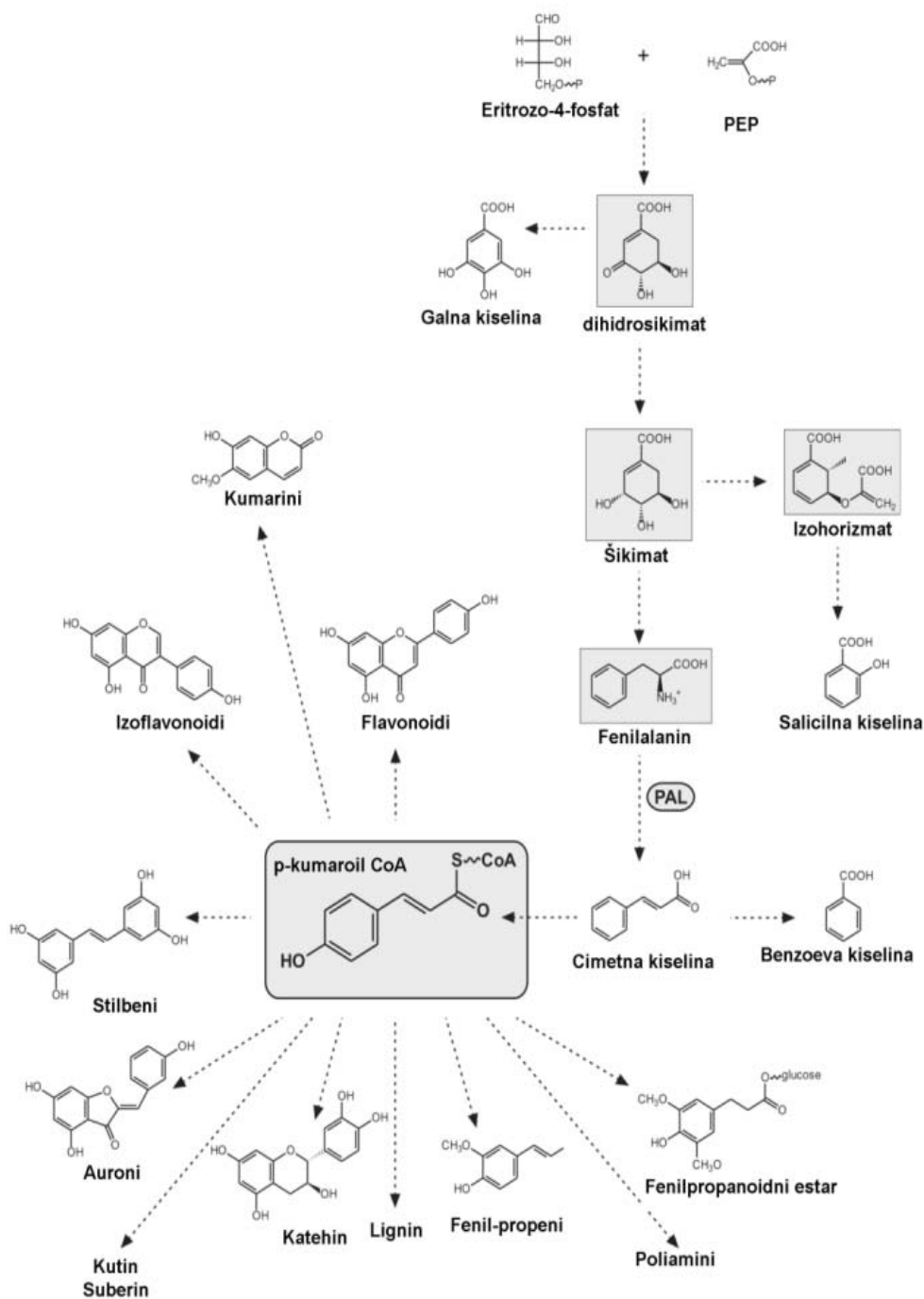
**Tabela 2.** Prikaz fenolnih kiselina zastupljenih kod nekih vrsta roda *Nepeta*

Jedinjenje	Vrsta	Reference
<b>Ruzmarinska kiselina</b>	<i>N. apulei</i> Ucria ex Guss.	Formisano i sar. 2011.
	<i>N. cadmea</i> Boiss.	Takeda i sar. 1998.
	<i>N. cataria</i> L. ssp. <i>citriodora</i> Backer	Modnicki i sar. 2007.
	<i>N. nepetalla</i> ssp. <i>cordifolia</i>	Formisano i sar. 2011.
	<i>N. pratti</i> Lèvl.	Hou i sar. 2002.
	<i>N. tuberosa</i> L. ssp. <i>reticulata</i> Desf.	Formisano i sar. 2011.
	<i>N. transcaucasica</i> Grossh.	Kraujalis i sar. 2011.
	<i>N. bulgaricum</i>	Kraujalis i sar. 2011.
	<i>N. caesarea</i> Boiss.	Topçu i sar. 2000.
<b>Kafeinska kiselina</b>	<i>N. cataria</i> L.	Proestos i sar 2006.
	<i>N. cataria</i> L. ssp. <i>citriodora</i> Backer	Formisano i sar. 2011.
	<i>N. nepetalla</i> ssp. <i>cordifolia</i>	Formisano i sar. 2011.
	<i>N. pratti</i> Lèvl.	Hou i sar. 2002
<b>Hlorogena kiselina</b>	<i>N. sibthorpii</i> Bentham	Galati i sar. 2006; Micel i sar. 2005.
<b>Galna kiselina</b>	<i>N. cataria</i> L.	Proestos i sar, 2006.
	<i>N. melissifolia</i> Pers.	Proestos i sar. 2013.
<b>Ferulinska kiselina</b>	<i>N. cataria</i> L.	Proestos i sar, 2006.
	<i>N. nepetalla</i> ssp. <i>cordifolia</i>	Formisano i sar. 2011.
	<i>N. septemcrenata</i> Erenb.	El-Moaty, 2009.
	<i>N. tuberosa</i> L. ssp. <i>reticulata</i> Desf.	Formisano i sar. 1985.
<b>Kumarna kiselina</b>	<i>N. cataria</i> L. ssp. <i>citriodora</i> Backer	Modnicki i sar. 2007.
	<i>N. nepetalla</i> ssp. <i>cordifolia</i>	Formisano i sar. 2011
	<i>N. tuberosa</i> L. ssp. <i>reticulata</i> Desf.	Formisano i sar, 2011
<b>Vanilinska kiselina</b>	<i>N. nepetalla</i> ssp. <i>cordifolia</i>	Formisano i sar. 2011
	<i>N. tuberosa</i> L. ssp. <i>reticulata</i> Desf.	Formisano i sar. 2011.

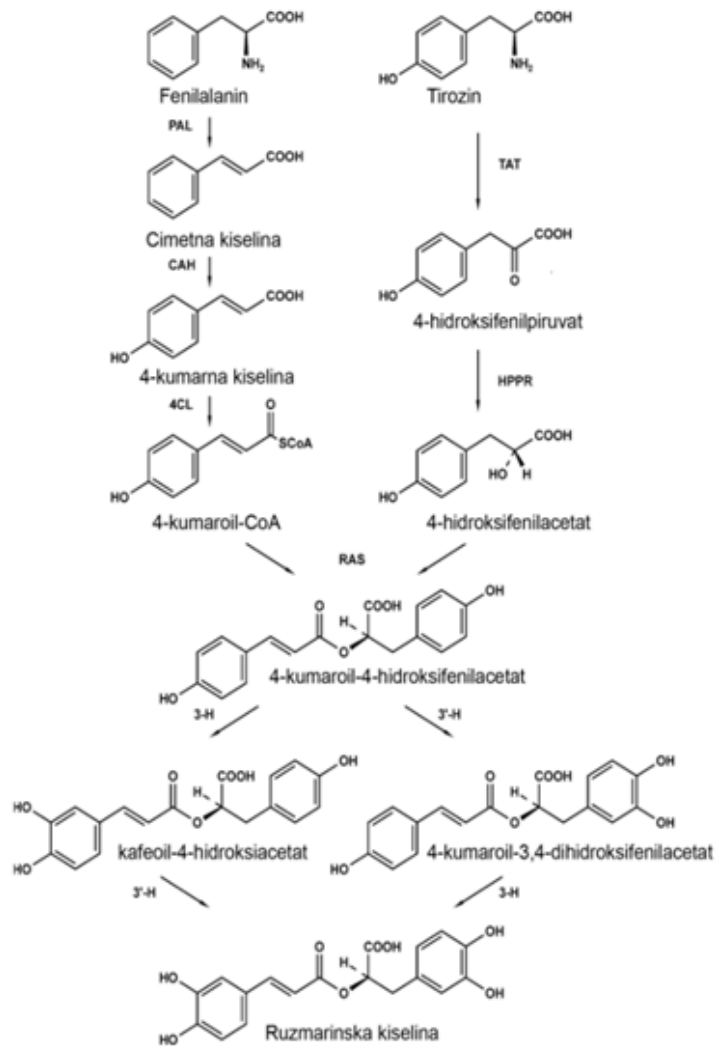


### 1.3.2. Biosinteza fenolnih jedinjenja

Najvažniji put biosinteze fenolnih jedinjenja kod viših biljaka je geranil fenilpropanoidni biosintetski put tj. ciklus šikimske kiseline (*Schmid i Amrhein, 1995*) (Slika 5). U geranil fenilpropanoidnom biosintetskom putu nastaju aromatične aminokiseline fenilalanin, tirozin i triptofan. Sve tri aminokiseline su prekursori mnogih sekundarnih metabolita. Od fenilalanina deaminacijom nastaje cimetna kiselina i sva jedinjenja koja imaju strukturu fenil-propana. Hidroksilacijom cimetne kiseline pomoću enzima cinamat-4-hidroksilaze (CAH), nastaje 4-kumarna kiselina (*Peterson, 1997*), dok u sledećem koraku, delovanjem enzima hidroksicinamat CoA ligaze (4CL), dolazi do formiranja CoA tioestra tj. 4-kumaroil-CoA kao i drugih estara cimetne kiseline (npr. hlorogene kiseline). Od tirozina, transaminacijom uz pomoć enzima tirozin aminotransferaze (TAT), nastaje 4-hidroksifenil piruvat, čijom redukcijom, u reakciji koju katalizuje hidroksifenilpiruvat reduktaza (HPPR), nastaje 4-hidroksifenil acetat (*DeEknankul i Ellis, 1987, Peterson i sar., 1993*). Oslobođanjem CoA iz kompleksa 4-kumaroil-CoA, dolazi do formiranja estra između karboksilne grupe kumarne kiseline i hidroksilne grupe 4-hidroksifenil acetata, pri čemu nastaje 4-kumaroil-4-hidroksifenil acetat (*Peterson, 1997*). Hidroksilacijom nastalog estra na jednom mestu, u delu kumarne kiseline, nastaje estar kafeinske kiseline, kafeoil-4-hidroksifenil acetat (*Matsuno i sar., 2002*), dok hidroksilacijom 4-kumaroil-4-hidroksifenil acetata na dva mesta u poziciji 3 i 3' nastaje 4-kumaroil-3,4-dihidroksifenil acetat. Od dva nastala estra formira se ruzmarinska kiselina (Slika 6).



**Slika 5.** Fenilpropanoidni biosintetski put. Skraćenice: **PEP**-fosfoenolpiruvat, **PAL**-fenilalanin amonijum lijaza. Predstavljena shema je modifikovana prema *Vogt, 2010*.



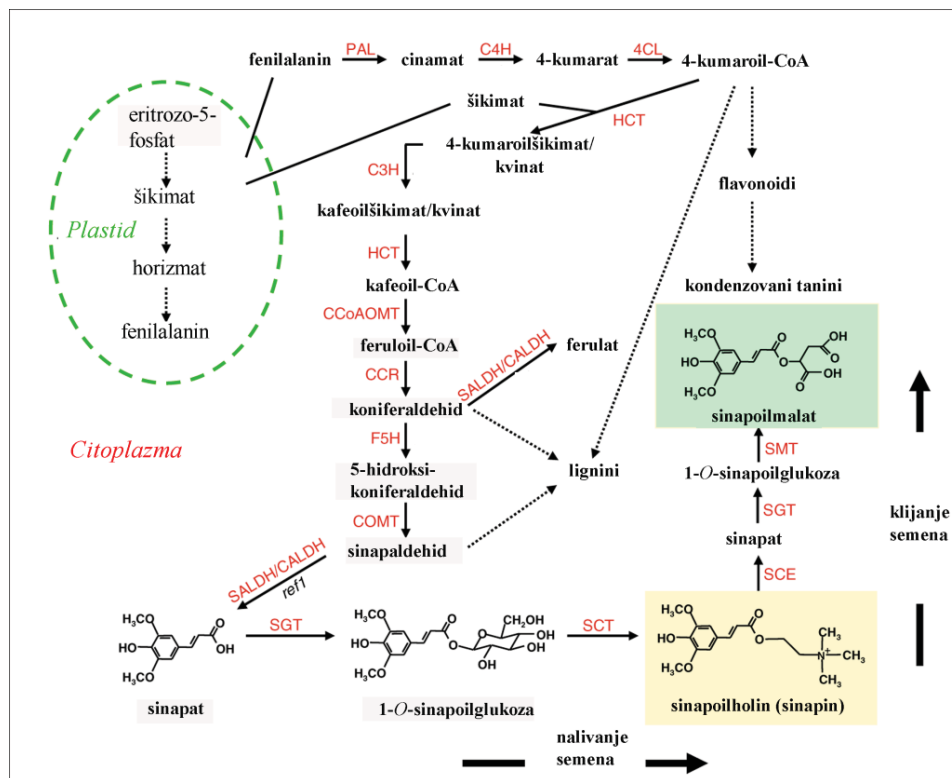
**Slika 6.** Biosintetski put ruzmarinske kiseline.

Skraćenice: **CAH**-cinamat-4-hidroksilaza, **4CL**-hidroksicinamat: CoA-ligaza, **TAT**-tirozin aminotransferaza, **HPPR**-hidroksifenilpiruvat reduktaza, **RAS**-hidroksicinamoil-CoA: hidroksifenilacetathidroksicinamoil transferaza, **3-H** i **3'-H** hidroksicinamoil-hidroksifenilacetat 3 i 3' hidroksilaza. Predstavljena shema je modifikovana prema Petersena i Simmonds, 2003.

### 1.3.3. Metabolizam fenolnih jedinjenja kod vrsta familije *Brassicaceae*

Vrste familije *Brassicaceae* metaboličku energiju sekundarnog metabolizma usmeravaju ka sintezi sinapata. Sinapati se, kao i druga fenilpropanoidna jedinjenja sintetišu u fenilpropanoidnom biosintetskom putu: od fenilalanina, preko 4-kumaroil-CoA, hidroksilacije kumaroilšikimata (Schoch i sar. 2001, Nair i sar. 2002, Franke i sar., 2002) i metilacije kafeoil-CoA (Slika 7).

Nastali koniferaldehid se hidroksilacijom prevodi u 5-hidroksi-koniferaldehid (*Meyer i sar., 1996, Humphreys i sar., 1999, Osakabe i sar., 1999*), čijom metilacijom nastaje sinapaldehid. Dejstvom sinapaldehid dehidrogenaze (SALDH) iz sinapaldehida nastaju sinapati (*Nair i sar. 2000, 2002, Franke i sar., 2002*). U reakciji koju katalizuje enzim sinapat glukoziltransferaza (SGT) nastaje sinapoilglukoza, iz koje dejstvom enzima sinapoilglukoza: holin sinapoiltransferaze (SCT) nastaje sinapin (sinapoilholin). Sinapin predstavlja dominantno fenolno jedinjenje koje se akumulira u semenima vrsta roda *Brassicaceae* tokom njihovog sazrevanja i nalivanja, a koje se hidrolizuje za vreme klijanja. Moguća fiziološka i ekološka uloga estera karakterističnog za semena još uvek nije razjašnjena, ali se pretpostavlja da estar sinapoilholin nastaje radi skladištenja holina, koji se kasnije prilikom klijanja semena uključuje u primarni metabolizam. Holin je, sam po sebi, higroskopian molekul, dok je u kompleksu sa sinapatima manje higroskopian. Za vreme klijanja, aktivnošću esteraza, dolazi do hidrolize sinapina (*Tzagoloff, 1963, Nurmman i Strack, 1979, Strack, 1980*). Na početku klijanja sinapin esteraza (SCE) hidrolizuje sinapilholin do sinapata, dok se u mladim kljancima nastali sinapat ponovo esterifikuje preko sinapoilglukoze u sinapoilmalat, u reakciji koju katalizuju enzimi SGT i SMT (sinapoilglukoza: malat sinapoiltransferaza). Prilikom formiranja sinapoilmalata dolazi i do oslobađanja manje količine slobodnog holina, koji se može uključiti u biosintezu fosfatidilholina (*Strack, 1981, Milkowski i sar., 2004, 2010*).



**Slika 7.** Biosintetski put estara sinapata kod *Arabidopsis thaliana* i *Brassica napus*. Skraćenice: **PAL**- fenilalanin-amonijum liaza, **C4H**- cinamat-4-hidroksilaza, **4CL**-4-kumarat: CoA ligaza, **HCT**- hidroksicinamoil transferaza, **C3H**- 4-kumaratestar 3-hidroksilaza, **CCoAOMT**- koniferil-CoA o-metiltransferaza, **CCR**- cinamoil-CoA reduktaza, **F5H**- ferulat 5-hidroksilaza, **COMT**- kafeoil O-metiltransferaza, **SALDH/CALDH**- sinapaldehyd/koniferaldehyd dehidrogenaza, **SGT**- sinapat glukoziltransferaza, **SCT**- sinapoylglukoza: malat sinapoyltransferaza, **SCE**- sinapin esteraza, **SMT**- sinapoylglukoza: malatsinapoyltransferaza. Predstavljena shema je modifikovana prema *Milikowski* i *Strack*, 2010.

#### 1.4. Biološka aktivnost vrsta roda *Nepeta*

Vrste roda *Nepeta* imaju veliki broj farmakoloških i bioloških aktivnosti koje se uglavnom pripisuju nepetalaktonu. Ljudi su ih decenijama koristili u narodnoj medicini za lečenje glavobolje, groznice, zubobolje, ali i u kulinarstvu. Alkoholni ekstrakti nekih vrsta roda *Nepeta* koriste se kod reumatskih, gastrointestinalnih i respiratornih tegoba, kao što su kolike, dijareja, astma, bronhitis (*Duke* i sar., 2002).

Takođe, poznato je i njihovo antiviralno (*Formisano i sar., 2011*), citotoksično (*Badisa i sar., 2003*), analgetičko (*Aydin i sar., 1999*) i antiinflamatorno dejstvo (*Miceli i sar., 2005*).

Pokazano je citotoksično dejstvo etarskog ulja *N. glomerata* na C32 (eng. C32 *amelanotic melanoma*) i ACHN (eng. *renall cell adenocarcinoma*) ćelijske linije kancera (*Rigano i sar., 2011*). Takođe je pokazano da etarsko ulje *N. caesarea* deluje kao analgetik, tako što blokira naloksone koji se vezuju za opioidne receptore. Ova biološka aktivnost etarskog ulja *N. caesarea* se može pripisati 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,4 $\alpha$ -nepetalaktonu, koji predstavlja dominantnu komponentu (95%) etarskog ulja ove vrste (*Aydin i sar. 1998*). Veoma važan farmakološki efekat nekih vrsta roda *Nepeta* ogleda se u sprečavanju nastanka ateroskleroze, smanjivanjem količine lipida i lipoproteina u organizmu (*Formisano i sar. 2011*). Postoje i komercijalni farmakološki suplementi koji sadrže etarsko ulje i vodeni ekstrakt cveta *N. hindostana*, koji deluju na smanjenje holesterola i triglicerida (*Arora i sar., 1985*). Etarsko ulje nekih vrsta roda *Nepeta* pokazuje antimikrobno dejstvo (*Sonboli i sar., 2004*, *Stojanović i sar., 2005*, *Adiguzel i sar., 2009*, *Alim i sar., 2009*). Intenzivno ispitivana vrsta ovog roda *N. cataria* pokazuje izraženi antioksidativni potencijal (*Adiguzel i sar., 2009*). Vodeni ekstrakti vrsta *N. nepetalla*, *N. coerules*, *N. tuberosa* imaju antivirusno dejstvo na dva različita tipa DNK i RNK virusa, a ispoljavaju i antivirusno dejstvo na viruse kao što su *Herpes simplex* tip I (HSV-1), pri čemu dolazi do inhibicije replikacije HSV-1 bez citotoksičnog efekta. Takođe, vodeni ekstrakt *N. nepetella*, *N. coerulea* i *N. tuberosa* deluje i na *Vesicular stomatitis virus* (*Bedoya i sar., 2002*).

Pokazano je da nepetalinska kiselina i nepetalakton imaju efekat na centralni nervni sistem miševa i pacova (*Harney i sar., 1978*). Ekstrakt *N. cataria* koji sadrži nepetalakton, nepetalinsku kiselinu, timol, citronelol i geraniol izaziva pospanost, smanjenje krvnog pritiska i utiče na pamćenje (*Formisano i sar., 2011*). Etarsko ulje *N. sibthorpii* dovodi do izmene uobičajenih obrazaca ponašanja kog glodara (*Galati i sar., 2004*), dok hidroalkoholni ekstrakt *N. persica* pokazuje anksiolitički efekat sa manjim sedativnim i hipnotičkim dejstvom od diazepama (*Rabbani i sar., 2008*). Jedinjenja iz *N. cataria* izazivaju jedinstveni način ponašanja kod velikog broja vrsta fam. *Felideae*.

Najviše ispitivana vrsta ovog roda *N. cataria*, koja se još naziva i mačja metvica, deluje kao seksualni atraktant kod mačaka (*Bates i Sigel, 1963*). Ovi autori su pokazali da na ponašanje kod mačaka intenzivnije utiče *cis,trans*- stereoisomer nepetalaktona ( $4\alpha,7\alpha,4\alpha$ ) u odnosu na *tran,cis*-nepetalakton ( $4\alpha,7\alpha,4\alpha\beta$ ).

Ranija istraživanja biološke aktivnosti vrsta roda *Nepeta* i nepetalaktona uključuju i repelentnu aktivnost protiv komaraca, bubašvaba, muva, crva i krpelja (*Peterson i Coats 2001, Peterson i sar., 2002, Chauhan i sar., 2005, Bernier i sar., 2005, Webb i Russel, 2007, Palsomboon i sar., 2008, Spero i sar., 2008, Birkett i sar., 2010*). *Trans,cis*-stereoisomer nepetalaktona pokazuje veoma toksično dejstvo i jaču repelentnu aktivnost na bubašvabe od *cis,trans*-stereoisomera (*Peterson i Coats, 2001, Peterson i sar., 2002, Gkinis i sar., 2003*), dok oba stereoisomera nepetalaktona pokazuju repelentnu aktivnost na komarce (*Coats i sar., 2003, Schultz i sar., 2004*). *Trans,cis*- i *cis,trans*-nepetalakton su feromoni pčela, mada jače dejstvo ispoljava *trans,cis*-nepetalakton (*Birkett i Pickett, 2003*).

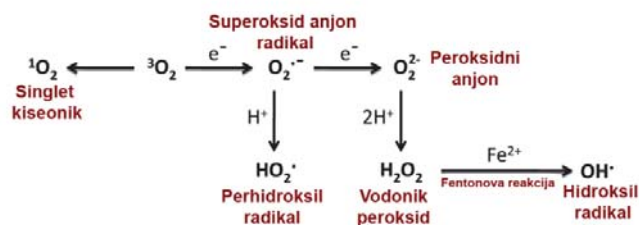
Etarsko ulje nekih vrsta roda *Nepeta* pokazuje fitotoksičnu aktivnost na veliki broj korovskih vrsta i poljoprivrednih kultura, ali mehanizam dejstva do danas nije poznat. Pokazano je da etarska ulja vrsta roda *Nepeta* imaju izražen inhibitorni efekat na rast nadzemnog dela i korena klijanaca *Lepidium sativum* (*Mutlu i Atici, 2009*). Nedavno je objavljeno da etarsko ulje *N. meyeri* dovodi do oksidativnog stresa kod klijanaca nekih korovskih vrsta (*Mutlu i sar., 2011*).

#### **1.4.1. Antioksidativna aktivnost**

Tokom normalnih fizioloških procesa, ali i u stresnim uslovima, u ljudskom organizmu dolazi do produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (*ROS*, eng. *Reactive Oxygen Species*) i enzimskih antioksidanasa. Termin antioksidansi ne podrazumeva grupu jedinjenja koja su slična po hemiskoj strukturi, već je to opšti naziv za sva jedinjenja koja mogu sprečiti ili bar smanjiti oksidaciju supstrata.

Neravnoteža između nastalih slobodnih radikala i antioksidanasa dovodi do oksidativnog oštećenja makromolekula ćelije (Aruoma i sar., 1998, Lefer i Granger, 2000, Smith i sar., 2000, Bhatia i sar., 2003, Peuchant i sar., 2003), kao što su peroksidacija membranskih lipida, oksidativno oštećenje nukleinskih kiselina i šećera, oksidacija sulfonskih i drugih grupa u proteinima. Sve promene na makromolekulima ćelije vode ka nastanku mnogih zdravstvenih poremećaja kod ljudi (Uchida i sar., 2000, Steer i sar., 2002).

Slobodni radikali su molekuli koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, što dovodi do njihove izražene reaktivnosti. Radikali koji imaju nesparen elektron na kiseonikovom atomu pripadaju grupi reaktivnih kiseoničnih vrsta. U ovu grupu se ubrajaju: superoksid radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ), perhidroksi radikal ( $HO_2^{\cdot}$ ) i alkoksi radikali ( $RO^{\cdot}$ ). Postoje i neradikalne vrste koje sadrže kiseonik kao što su vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), singlet kiseonik ( $^1O_2$ ) i ozon ( $O_3$ ) (Gill i Tuteja, 2010) (Slika 8). U nedostatku antioksidanasa koji mogu neutralisati reaktivne slobodne radikale, dolazi do nastanka mnogih bolesti (Shahidi i sar., 1992), kao što su kardiovaskularna oboljenja i kancer (Gerber i sar., 2002), neurodegenerativne bolesti, Alchajmerova bolest (Di Matteo i Esposito, 2003) i inflamatorna oboljenja (Sreejayan i Rao, 1996). Postoji veliki broj sintetičkih antioksidanasa koji se upotrebljavaju u prehrambenoj industriji, uključujući butilovani hidroksitoluen (BHT) i butilovani hidroksianisolen (BHA). Smatra se da su upravo sintetički antioksidansi odgovorni za nastanak mnogih oboljenja povezanih sa oštećenjem jetre i karcinogeneze (Grice i sar., 1988, Wichi i sar., 1986).



**Slika 8.** Nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta ROS (eng. *Reactive Oxygen Species*). Predstavljena shema je modifikovana prema Gill i Tuteja, 2012.



U poslednje vreme velika pažnja se posvećuje preventivnoj medicini koja propagira upotrebu antioksidanasa biljnog porekla u ishrani i u terapiji. Prisustvo neenzimskih antioksidanasa kao što su vitamin C, vitamin E, karoteni, ksantofili i tanini, opravdava ulogu lekovitog i začinskog bilja kao moćnih antioksidanasa. U okviru prirodnih jedinjenja koja imaju veliki antioksidativni potencijal posebno se ističu fenolne kiseline (galna, kafeinska, ruzmarinska kiselina), fenolni diterpeni (karnozol), flavonoidi (kvercetin, katehin), kao i konstituenti etarskih ulja (*Shan i sar.*, 2005, *Galati i sar.*, 2006).

Poređenjem antioksidativnog potencijala fenolnih jedinjenja i terpenoida, fenolna jedinjenja su se pokazala kao bolji antioksidansi (*Bramley i sar.*, 2000, *Davey i sar.*, 2000, *Harbone i Williams*, 2000, *Parr i Bowell*, 2000, *Pietta*, 2000, *Kim i Lee*, 2004, *Asard i sar.*, 2004), a to se pripisuje njihovoj osobini da lako predaju vodonikov atom.

#### 1.4.1.1. Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja

Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja se zasniva na direktnoj reakciji fenola i slobodnih radikala, a ovaj proces se na molekularnom nivou može odvijati na tri načina (*Leopoldini i sar.*, 2004a, 2004b, 2004c, *Wright i sar.*, 2001):

##### 1. Prenos vodonikovog atoma



**Slika 9.** Mehanizam dejstva fenolnih jedinjenja u reakciji uklanjanju slobodnih radikala. Prenos vodonikovog atoma sa fenolnog jedinjenja na slobodni radikal.

Prvi način uklanjanja slobodnih radikala ( $R\cdot$ ) se zasniva na homolitičkom cepanju O-H grupe i prenosu vodonikovog atoma sa fenolnog jedinjenja ( $\text{Ar-OH}$ ) na slobodni radikal. U opisanoj reakciji ponovo nastaje radikal ( $\text{ArO}\cdot$ ) koji je manje reaktivan, zbog sposobnosti nastalog fenol radikala da stabilizuje i delokalizuje nespareni elektron (Slika 9).

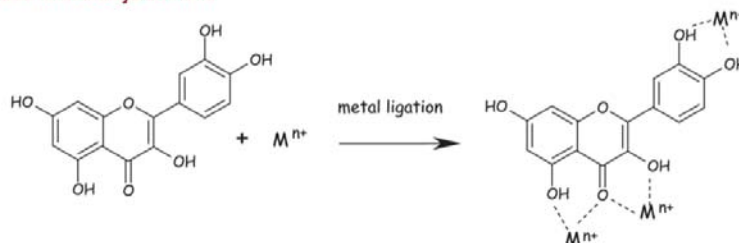
### 2. Prenos elektrona



Slika 10. Mehanizam dejstva fenolnih jedinjenja u reakciji uklanjanju slobodnih radikala. Prenos elektrona sa fenolnog jedinjenja na slobodni radikal.

Drugi mehanizam se zasniva na prenosu jednog elektrona sa fenolnog jedinjenja, pri čemu nastaju katjonski radikal ( $\text{ArOH}^{\bullet+}$ ) i anjon ( $\text{R}^{-}$ ) (Slika 10). Nastali anjon ima sponen broj elektrona i pri tome je energetski stabilizovan, dok je aromatična struktura sa preostalim elektronom takođe stabilizovana delokalizacijom elektrona i postojanjem više rezonantnih oblika. (Leopodini i sar., 2004a, Wright i sar., 2001).

### 3. Helatizacija metala



Slika 11. Mehanizam dejstva fenolnih jedinjenja u reakciji uklanjanju slobodnih radikala. Vezivanje metala od strane fenolnog jedinjenja.

Treći mehanizam se bazira na sposobnosti fenolnih jedinjenja da vezuju za sebe metale, formirajući stabilne komplekse, što sprečava učešće metala u reakcijama u kojima se proizvode slobodni radikali (Slika 10) (Brown i sar., 1998, Jovanović i sar., 1998, van Acker i sar., 1996). Poznato je da neki metali u nižem oksidacionom stanju mogu da učestvuju u Fentonovoj reakciji (Schulz i sar., 2000) sa  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pri čemu dolazi do formiranja  $\text{OH}^{\bullet}$  radikala koji je veoma reaktivan i jedan od najštetnijih radikala u biljnom tkivu.

#### 1.4.1.2. Monoterpenoidi kao antioksidansi

Glavni sastojci etarskih ulja takođe imaju antioksidativni potencijal. Monoterpenoidi su veoma efikasni u sprečavanju lipidne peroksidacije, što je od velikog značaja u ljudskom organizmu. Monoterpenoidi štite *LD* lipoproteine (*LDL* eng. *Low Density Lipoproteins*) od oksidacije, i samim tim smanjuju rizik od nastanka mnogih srčanih oboljenja. Pokazan je veliki oksidativni potencijal  $\gamma$ -terpinena (monoterpenoid), koji hidrofobnim interakcijama reaguje sa *LDL* partikulama i sprečava njihovu oksidaciju (*Takahashi* i sar., 2003). Monoterpenoidi pokazuju sinergistički efekat u dejstvu sa drugim antioksidansima, kao što je npr.  $\alpha$ -tokoferol (*Wagner i Elmadfa*, 2003). Međutim, poslednjih godina je pokazano da postoji i antagonistički efekat između antioksidativne aktivnosti glavnih komponenti etarskih ulja, ali i između fenolnih jedinjenja i terpenoida (*Azza* i sar., 2011, *Motohashi* i sar., 2002, *Perry* i sar., 2003).

#### 1.4.1.3. ROS kod biljaka

*ROS* nastaju u ljudskom organizmu, ali i kod biljaka, kao rezultat dejstva različitih abiotičkih i biotičkih faktora kao što su: *UV* zračenje, suša, teški metali, ekstremne temperature, nedostatak hranljivih materija, herbicidi, napad patogena, alelopatske interakcije, ali i kao sporedni produkti metaboličkih puteva u fiziološkim uslovima (*Gill i Tuteja*, 2010). Fotosistemi I i II u hloroplastima su glavna mesta produkcije  $^1\text{O}_2$  i  $\text{O}_2^-$  (*Foyer* i sar., 2005), dok u mitohondrijama dolazi do stvaranja  $\text{O}_2^-$ . *ROS* takođe mogu nastati i u citosolu i u endoplazmatičnom retikulumu za vreme detoksifikacije (*Dybing* i sar., 1976). U biljnom tkivu *ROS* dovode do nepovratne oksidacije proteina kao i do karbonilacije uskladištenih proteina u semenima, koja se značajno povećava za vreme klijanja semena (*Job* i sar., 2005). *ROS* dovode do oštećenja svih komponenti DNK molekula, deluju na purinske i pirimidinske baze, ali i na dezoksiribozu (*Halliwell* i sar., 1999), uzrokujući deleciju baza i njihovu alkilaciju ili oksidaciju (*Wiseman* i sar., 1996, *Tuteja* i sar., 2001).

U biljnim ćelijama *ROS* mogu imati i pozitivan efekat, kao što je to slučaj u različitim stadijumima razvoja semena (od embriogeneze do klijanja). U suvim semenima, za koje je karakteristična veoma slaba enzimska aktivnost, jedini način produkcije *ROS* je lipidna peroksidacija i minimalni nivo disanja za koju je potrebna mala količina vlage (*Priestley* i sar., 1986, *Sun* i sar., 1995, *McDonald*, 1999). Međutim, kada se poveća sadržaj vlage u semenima, dolazi do značajnih promena u metabolizmu koje dovode do klijanja semena (*Bouteau* i *Bailly*, 2008). Mnoga istraživanja pokazuju da je prelazak semena iz faze mirovanja u metabolički aktivnu fazu povezan sa produkcijom *ROS*. Pokazano je da u periodu rane imbibicije dolazi do produkcije vodonik peroksida kod semena soje (*Puntarulo* i sar., 1988, *Puntarulo* i sar., 1991, *Gidrol* i sar., 1994), kukuruza (*Hite* i sar., 1999), suncokreta (*Bailly* i sar., 2002), pšenice (*Caliskan* i sar., 1998), graška (*Wojtyla* i sar., 2006), paradajza (*Morohashi* i sar., 2002), itd. Kao deo normalnih fizioloških procesa za vreme klijanja produkuju se i azot monoksid (*Caro* i sar., 1999, *Sarath* i sar., 2007), hidroksil radikali (*Schopfer* i sar., 2001), kao i superoksid radikali (*Puntarulo* i sar., 1991, *Gidrol* i sar., 1994, *Schopfer* i sar., 2001). Po svoj prilici, prilikom imbibicije semena, *ROS* se najviše produkuju u mitohondrijama tokom procesa disanja (*Moller* i sar., 2001).

Gliksizomi, koji su uključeni u metabolizam rezervnih lipida u semenima, produkuju veliku količinu vodonik peroksida koji nastaje aktivnošću enzima glikolat oksidaze (*Huang* i sar., 1983). Tačno mesto produkcije *ROS* za vreme klijanja semena nije precizno utvrđeno, ali se pretpostavlja da je to omotač semena ili aleuronski sloj (*Bailly*, 2004). Iako *ROS* predstavljaju signalne molekule veoma važne za proces klijanja, u semenima postoje posebni mehanizmi koji omogućavaju uklanjanje *ROS*, kao i regulaciju njihove koncentracije u tkivu (*Bouteau* i *Bailly*, 2008). *ROS*, a naročito vodonik peroksid, mogu indukovati ekspresiju gena koji su uključeni u kodiranje fosfataza, kinaza i enzima uključenih u antioksidativnu zaštitu (*Desikan* i sar., 2001, *Neill* i sar., 2002).

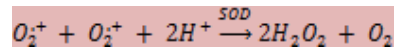
Antioksidativna jedinjenja i enzimi su od velikog značaja za sve faze u procesu klijanja semena. Primećeno je da u toku klijanja dolazi do promene količine  $\alpha$ -tokoferola (Simontacchi i sar., 1993, 2003, Yang i sar., 2001), flavonoida i fenola (Simontacchi i sar., 1993, Andarwulan i sar., 1999, Yang i sar., 2001). Rusydi i Azrina (2012) su pokazali da kod semena soje i pasulja u toku faze klijanja dolazi do opadanja količine fenolnih jedinjenja. Takođe, za vreme imbibicije dolazi do povećanja količine askorbata i glutaciona u semenima (Kranner i Grill, 1993, De Gara i sar., 1997, Tommasi i sar., 2001, Yang i sar., 2001, De Tullio i Arrigon, 2003). Značajne promene za vreme imbibicije i klijanja semena se dešavaju i na polju antioksidativnih enzima. Primećeno je da kod semena suncokreta dolazi do povećanja aktivnosti katalaza (CAT) i glutation reduktaza (GR) pre izbijanja radikule (Bailly i sar., 2000). Slično povećanje aktivnosti CAT za vreme klijanja je primećeno i kod semena kukuruza (Scandalios i sar., 1997, Hite i sar., 1999, Guan i Scandalios, 2002), soje (Puntarulo i sar., 1991; Gidrol i sar., 1994) i *Arabidopsis thaliana* (Gallardo i sar., 2001). Primećena je povećana aktivnost superoksid dismutaza i askorbat peroksidaza tokom klijanja semena duvana i ječma (Lee i sar., 2010c). Kod *A. thaliana* aktivnost peroksidaza je detektovna u endospermu i na ivicama kotiledona, dok je kod semena *Lepidium sativum* peroksidazna aktivnost detektovana u endospermu i radikuli, ali ne i u kotiledonima (Linkies i sar., 2010b).

#### 1.4.1.4. Enzimske komponente antioksidativnog sistema biljaka

U sprečavanju nagomilavanja štetnih ROS u biljnim tkivima, uključene su **enzimska komponenta antioksidativnog sistema** (SOD superoksid dismutaze, APOD askorbat peroksidaze, GPOD gvajakol peroksidaze, GR glutation reduktaze, GST glutation transferaze, MDHAR monodehidroaskorbat reduktaze, DHAR dehidroaskorbat reduktaze i CAT katalaze) i **neenzimska komponenta antioksidativnog sistema** (askorbinska kiselina, glutation,  $\alpha$ -tokoferol, karotenoidi i flavonoidi) (Gill i sar., 2010).

#### 1.4.1.4.1. Superoksid dismutaze (SOD)

SOD (EC 1.12.1.1) su metaloenzimi koji predstavljaju prvu liniju odbrane od ROS. Ova grupa enzima uklanja superoksid radikale ( $O_2^{\cdot-}$ ), pri čemu nastaju  $H_2O_2$  i  $O_2$ .



SOD se klasifikuju na osnovu metalnog kofaktora koji enzim koristi, pa razlikujemo Fe-SOD, Mn-SOD i CuZn-SOD. U genomu *Arabidopsis thaliana* okarakterisana su tri gena koji kodiraju Fe-SOD, tri CuZn-SOD gena i jedan gen za Mn-SOD (Kliebenstein i sar., 1998). Aktivnost SOD izoenzima može biti detektovana na osnovu njihove različite osetljivosti na dejstvo inhibitora KCN i  $H_2O_2$ . Mn-SOD su otporne na dejstvo oba inhibitora, CuZn-SOD su osetljive na oba inhibitora, dok su Fe-SOD otporne na dejstvo KCN a osetljive na dejstvo  $H_2O_2$  (Gill i Tuteja, 2010). Značajno je napomenuti da postoji subćelijska lokalizacija izoenzima SOD. Mn-SOD su pronađene u mitohondrijama i peroksizomima (del Rio i sar., 2003), CuZn-SOD su detektovane u hloroplastima i citosolu (del Rio i sar., 2002), dok su Fe-SOD detektovane samo u hloroplastima (Alscher i sar., 2002).

**Fe-SOD** su zastupljene u prokariotskim i u eukariotskim ćelijama. Smatra se da je Fe-SOD prvi SOD izoenzim koji je nastao tokom evolucije, zbog velike raspoloživosti slobodnog Fe (II) u vreme nastanka enzima.

Kako se količina  $O_2$  u prirodi povećavala, tako se povećavala i količina oksidovanih mineralnih komponenti, a samim tim je došlo do smanjenja količine dostupnog Fe (II), pa je ovaj metal na aktivnom mestu enzima zamenio mnogo dostupniji metal Mn (III) (Bannister i sar., 1991). Postoje dve različite grupe Fe-SOD. Prvu grupu čini homodimerni enzim koji je izgrađen od dve identične proteinske subjedinice, veličine 20 kDa. Nalazi se kod prokariota i u plastidima nekih evolutivno starijih biljaka (Salin i Bridges, 1981.). Kod većine viših biljaka prisutan je tetramerni enzim, izgrađen od četiri identične proteinske subjedinice veličine 80-90 kDa (Kusunose i sar., 1976, Kirby sar., 1981, Barro i sar., 1990).

**Mn-SOD** su prisutne i kod prokariota i kod eukariota, i njihova primarna, sekundarna i tercijarna struktura je veoma slična sa Fe-SOD (*Fridovich, 1986*). Postoje kao homodimeri, koji su izgrađeni od dve identične subjedinice veličine 40 kDa, ili i kao homotetrameri koji su izgrađeni od četiri identične subjedinice od 80 kDa, pri čemu sadrže samo po jedan Mn(III) atom po subjedinici.

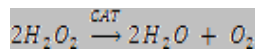
**CuZn-SOD** se javljaju uglavnom kod eukariota. Kada je zemljina atmosfera postala potpuno zasićena kiseonikom, Fe (II) je postalo nedostupno biljkama, a nerastvorni Cu (I) je prešao u rastvorni Cu (II) koji je mogao biti upotrebljen kao metalni kofaktor na aktivnom mestu SOD. Postoje dve grupe CuZn-SOD: 1) homodimerne citoplazmatične i periplazmatične CuZn-SOD i 2) homotetramerne hloroplastne CuZn-SOD (*Alcher i sar., 2002*). Lokalizacija i osetljivost na dejstvo inhibitora SOD izoformi predstavljena je u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Lokalizacija i osetljivost na dejstvo inhibitora pojedinih SOD izoformi

SOD izoforme	Lokalizacija	Otporne na	Osetljive na
<b>Fe-SOD</b>	Hloroplasti	KCN	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Mn-SOD</b>	Mitohondrije i peroksizomi	KCN i H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-
<b>CuZn-SOD</b>	Hloroplasti i citosol	-	KCN i H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

#### 1.4.1.4.2. Katalaze (CAT)

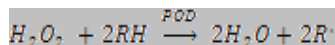
Katalaza (EC 1.11.1.6) je široko rasprostanjen enzim, koji je zastupljen kod gotovo svih organizama, počev od mikroorganizama (aerobnih i anaerobnih), biljaka, životinja do čoveka. Katalaza je tetramer sastavljen od četiri polipeptidna lanca, od kojih svaki sadrži preko 500 aminokiselina. U sastav enzima ulaze četiri porfirinska hema, grupe koje omogućavaju enzimu da reaguje sa vodonik peroksidom. Katalaze predstavljaju grupu metalo-enzima koje katalizuju reakciju dismutacije vodonik peroksida do vode i kiseonika (*Garg i sar., 2009*).



Katalaza je veoma aktivan enzim: jedan molekul katalaze prevodi million molekula vodonik peroksida do vode i kiseonika u sekundi (Garg, 2009). U biljnim ćelijama se ovi enzimi najčešće sreću na mestima povećane produkcije vodonik peroksida, tj. u peroksizomima, glioksizomima i citosolu (Tolbert, 1980; Dat i sar., 2000). Pored CAT koje u svom aktivnom centru sadrže gvožđe, postoje i CAT u čijem aktivnom centru se nalazi Mn. Mn-CAT su otkrivene kod *Lactobacillus plantarum* i kod nekih termofilnih bakterija (Kono i Fridovich, 1983).

#### 1.4.1.4.3. Peroksidaze (POD)

Peroksidaze (EC 1.11.1.7) su glikoproteini izgrađeni od jedne subjedinice i veoma su rasprostranjenije u biljnom svetu. Peroksidaze katalizuju reakciju oksidacije supstrata, pri čemu nastaje voda i oksidovani radikalski produkt (Veitch, 2004):



Na osnovu primarne strukture proteina, peroksidaze se mogu podeliti u III klase:

- I. citohrom C peroksidaze (EC 1.11.1.5), askorbat peroksidaze (EC 1.11.1.11) i neke bakterijske peroksidaze čine prvu grupu enzima. Njihovu primarnu strukturu čine: N-terminalni signalni peptid, disulfidni mostovi, ugljeni hidrati i kalcijum (Veitch, 2004).
- II. peroksidaze koje sa nalaze kod gljiva, uključujući lignin peroksidaze (EC 1.11.1.14) i mangan peroksidaze (EC 1.11.1.13), predstavljaju grupu ekstracelularnih enzima koji u svom sastavu poseduju N-terminalni signalni peptid, četiri disulfidna mosta (drugačije lokalizovanih u poređenju sa klasom III peroksidaza), kalcijum, ugljene hidrate i C-terminalni domen koji poseduje oko 60 aminokiselinskih ostataka manje nego klase I i III peroksidaza (Veitch, 2004).
- III. enzimi (EC 1.11.1.7), prvobitno opisani kao peroksidaze, se transportuju u vakuole ili izlučuju iz ćelije (Rahnema i Ebrahimzadeh, 2006). Ova grupa enzima kao elektron donore najčešće koristi fenole (Welinder i Gajhede, 1992). Primarnu strukturu III grupe peroksidaza čine N-terminalni signalni peptid, četiri konzervirana disulfidna mosta, kalcijum i ugljeni hidrati (Veitch, 2004).



POD se nalaze u vakuolama, peroksizomima, ćelijskom zidu, citoplazmi (*Schlos* i sar., 1987). Poseduju veliki broj fizioloških funkcija u biljnom organizmu, učestvuju u biosintezi lignina i suberina (*Quiroga* i sar., 2000), biosintezi etilena, degradaciji indol-3-sirćetne kiseline (*Macháčková* i *Zmrhal*, 1981., *Lee*, 1977), imaju važnu ulogu pri odbrani od patogena (*Stout* i sar., 1999) itd.

#### **1.4.1.4.4. Polifenol oksidaze (PPO)**

PPO (1,2-benzendiol: kiseonik oksidoreductaze EC. 1.10.3.1) su poznate i kao tirozinaze, polifenolaze, katehol oksidaze, krezolaze (*Whitaker* i sar., 1996). PPO pripadaju grupi metaloenzima sa bakrom u aktivnom centru, i široko su zastupljeni u hloroplastima biljaka (*Mayer* i *Harel*, 1979). Fizička povreda ćelijske strukture dovodi do oslobađanja PPO iz hloroplasta i njihovog fenolnog supstrata iz vakuola (*Mishra* i sar., 2012). PPO katalizuju hidroksilaciju monofenola do *o*-difenola, nakon čega aktivnošću monofenolaza i kasnijom oksidacijom od *o*-difenola nastaju *o*-kinoni koji imaju kateholaznu/difenolaznu aktivnost (*Mayer*, 2006) i čijom aktivnošću, u prisustvu kiseonika nastaje tamno obojeni pigment – melanin (*Madinez* i *Whitaker*, 1995).

Tačna uloga PPO nije u potpunosti razjašnjena. Zapaženo je da se aktivnost ovog enzima povećava tokom izlaganja biljaka različitim abiotičkim agensima, i da dovodi do povećanja otpornosti biljaka na novonastale stresne uslove (*Thipyapong* i sar., 1995, 1997). Povećana produkcija PPO u biljkama može biti rezultat napada insekata ili patogena (*Mayer* i *Harel* 1979, *Steffens* i sar., 1994, *Constabel* i sar., 1995, *Thipyapong* i sar., 1995, *Thipyapong* i *Steffens* 1997). Poznato je da PPO učestvuje u procesima kao što su lignifikacija i formiranje pigmenta (*Bolaños* i *Silva*, 2004, *Richardson* i *McDougall*, 1977).

#### 1.4.1.4.5. Antioksidativni enzimi vrsta fam. *Brassicaceae*

Kao rezultat dejstva različitih abiotičkih i biotičkih faktora, kod najviše ispitivane vrste familije *Brassicaceae* (*Arabidopsis thaliana*) postoji veliki broj istraživanja u pogledu stvaranja ROS i uključivanja antioksidativnih enzima. Drazkiewicz i sar., (2004) su pokazali da pod dejstvom teških metala (bakar) kod *A. thaliana* dolazi do stvaranja velike količine  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , i  $OH$ . Takođe, primećena je velika aktivnost SOD i POD, dok je aktivnost CAT veoma slaba. Pretpostavlja se da velika količina  $O_2^-$  inhibira aktivnost CAT. Ista vrsta stresa je kod *Ceratophyllum demersum* (fam. *Ceratophyllaceae*) za razliku od *A. thaliana*, dovela do velike aktivnosti CAT (Devi i Prasad, 1998). Kubo i sar. (1999) su ispitivali delovanje različitih vrsta stresa na aktivnost antioksidativnih enzima. U zavisnosti od tipa stresa biljke su imale različiti antioksidativni odgovor. Visoka temperatura i nedostatak svetlosti dovode do povećanja aktivnosti monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR). Vodni deficit takođe utiče na povećanje aktivnosti MDHAR kao i gvajakol peroksidaza (GPOD), dok visoke temperature povećavaju aktivnost askorbat peroksidaza (APOD) i glutation reduktaza (GR), a dovode do smanjenja aktivnosti CAT. Visok intenzitet UV B zračenja dovodi do najizraženijeg povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima kod *A. thaliana* (dolazi do povećane aktivnosti APOD, MDHAR, GR, GPOD, SOD). Poslednjih godina raste interesovanje za upotrebu kresa (*Lepidium sativum*) kao test vrste u mnogim eksperimentima, u prvom redu zbog lake dostupnosti ove vrste, kao i zbog kratkog perioda klijanja semena, itd. Prilikom tretmana klijanaca kresa teškim metalima (olovo) primećeno je da dolazi do povećanja aktivnosti SOD, dok povećana aktivnost POD i CAT nije zabeležena (Ibrahim i Bafeel, 2011). Sa povećanjem koncentracije kadmijuma takođe dolazi po porasta aktivnosti nekih antioksidativnih enzima kod navedene vrste (SOD, APOD, GR, i CAT) (Gill i sar., 2012).

### 1.4.2. Antimikrobna aktivnost

Iako je farmaceutska industrija u poslednje vreme veoma razvijena, sve više raste broj patogenih mikroorganizama koji su otporni na antibiotike. Strategija farmaceutske industrije ogleda se u izmenama molekulske strukture postojećih antibiotika u cilju poboljšanja njihove efikasnosti. Međutim, bakterije poseduju genetičku sposobnost da veoma brzo postignu i rašire rezistentnost i na novo-primenjena sintetička jedinjenja. Pored sintetisanih molekula, prirodni proizvodi su jedan od glavnih izvora novih terapijskih agenasa za različite bolesti uključujući i bolesti izazvane patogenim mikroorganizmima (*Nascimento i sar.*, 2000, *Sakagami i sar.*, 2002).

Intezivne studije su poslednjih godina usmerene ka ispitivanju mogućnosti upotrebe biljnih ekstrakata i etarskih ulja u tretmanima protiv patogenih bakterija i gljiva (*Chalchat i sar.*, 1998, *Salehi i sar.*, 2007, *Ljaljević Grbić i sar.*, 2008, *Celik i sar.*, 2008, *Hussain i sar.*, 2009, *Sonboli i sar.*, 2004, *Stojanović i sar.*, 2005). Hemijska jedinjenja izolovana iz biljaka, koja su odgovorna za antimikrobnu aktivnost su fenolne kiseline, kinoni, flavoni i flavonoidi, tanini, kumarini, terpenoidi, alkaloidi (*Cowan i sar.*, 1999). Od svih pomenutih jedinjenja, pokazano je da konstituenti etarskih ulja, terpenoidi pokazuju najveću antimikrobnu aktivnost (*Knobloch i sar.*, 1989). U pogledu dejstva na patogene mikroorganizme posebno se ističu oksidovani monoterpenoidi, kao sto su kamfor, eugenol, borneol, linalol i drugi (*Brand i sar.*, 1995).

Prirodna jedinjenja deluju na bakterijsku ćeliju tako što dovode do narušavanja citoplazmatične membrane i koagulacije ćelijskog sadržaja, utiču na aktivni transport i protok elektrona u ćeliji (*Burt i sar.*, 2004). Antibakterijske supstance iz etarskih ulja deluju kako na proteine, tako i na lipide citoplazmatične membrane bakterijske ćelije. Vezujući se za lipide membrane ova jedinjenja dovode do povećanja njene propustljivosti (*Sikemma i sar.*, 1994).

Ranija istraživanja su se bazirala na antibakterijskom potencijalu prirodnih produkata i njihovih derivata, dok je interesovanje za istraživanjem antifungalne aktivnosti počelo nešto kasnije (*Weidenbörner i Jha, 1994*). U poslednje vreme se velika pažnja posvećuje upotrebi etarskih ulja aromatičnih biljnih vrsta u sprečavanju rasta patogenih vrsta gljiva. *Dambolena i sar., (2010)* su pokazali da etarsko ulje *Ocimum basilicum* i *O. gratissimum* deluje mikrobiostatski na *Fusarium verticillioides* i takođe pokazuje inhibitorni efekat na produkciju mikotoksina. Isti autori navode da su dominantne monoterpenoidne i seskviterpenoidne komponente etarskih ulja odgovorne za antifungalnu aktivnost. Pored terpenoidnih jedinjenja *Weidenbörner i sar., (1989, 1990)* su pokazali mikrobiocidno dejstvo flavanona, flavona kao i izoflavona i izoflavanona na nekoliko vrsta roda *Aspergillus*. Predpostavlja se da prirodna antifungalna jedinjenja mogu imati inhibitorni efekat na neke od enzima koji su uključenu u sintezu mikotoksina, takođe mogu reagovati sa sulfonskim proteinskim grupama u membranama mada može doći i do nespecifičnog proteinskog vezivanja što dovodi do membranskog oštećenja koje neminovno utiče na ravnotežu neorganskih jona (*Cowan i sar., 1999, Lambert i sar., 2001*).

#### **1.4.2.1. Antimikrobna aktivnost vrsta roda *Nepeta***

Prva potvrda antimikrobne aktivnosti vrsta roda *Nepeta* datira iz 1974. godine kada su *Goutam i Purohit* pokazali antibakterijsku aktivnost etarskog ulja *N. hindostana* na *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pasteurella multocida* i *Sarcina lutea*. Takođe, etarsko ulje ove vrste pokazuje antifungalno dejstvo na nekoliko vrsta roda *Penicillium* i *Aspergillus*. Etarsko ulje *N. cataria* koje sadrži 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -nepetalakton (70.4%), 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalakton (6%) i 4 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,7 $\beta$ -nepetalakton (2.5%) pokazuje antimikrobnu aktivnost na pet testiranih vrsta bakterija i sedam testiranih vrsta gljiva, od čega na 44 soja *Staphylococcus aureus* rezistentnih na meticilin, kao i aktivnost protiv respiratornih bakterija i bakterija koje izazivaju kožne infekcije (*Bourel i sar. 1993*). Poznato je da etarsko ulje *N. camforata* i *N. argolica* ssp. *dirphyia*, koje sadrži 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -nepetalakton i 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalakton, pokazuje značajnu baktericidnu aktivnost protiv *Helicobacter pylori* (*Kalpoutzakis i sar., 2001*), uzročnika nekih gastrointestinalnih oboljenja.

Stereohemija nepetalaktona je veoma značajna za antibakterijsku i antigljivičnu aktivnost, pa tako *trans,cis*-stereoizomer nepetalaktona pokazuje znatno veću aktivnost protiv *H. pylori* nego *cis,trans*-nepetalakton (Kalpoutzakis i sar., 2001). Manja ili veća antimikrobna aktivnost vrsta roda *Nepeta* se može pripisati razlikama u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu etarskog ulja, naročito nepetalaktona. Moguć je takođe sinergistički i antagonistički efekat glavnih komponenti etarskih ulja sa jedinjenjima koja su manje zastupljena u biljci.

### 1.4.3. Alelopatija

Opisane hemijske interakcije između biljaka, koje mogu imati inhibitorni ili stimulatívni efekat na rast drugog učesnika alelopatske interakcije, predstavljaju alelopatiju u užem smislu (Molish, 1937), dok u širem smislu alelopatija predstavlja i hemijsku komunikaciju između mikroorganizama, između biljke i mikroorganizama kao i između biljaka i insekata (Weir i sar., 2004). Veliki broj prirodnih jedinjenja biljaka mogu biti inhibitori klijanja semena, rasteñja i razvića drugih biljnih vrsta u njihovom okruženju. Rice i saradnici (1984) navode derivate cimetine kiseline kao inhibitore klijanja i rasta, drugi autori navode kumarine, flavonoide, alkaloidne, cijano-glikozide, proteine i amino kiseline kao inhibitorna jedinjenja (Friedman i Waller, 1983, Putnam, 1985, Waller, 1989). Listi alelohemikalija se mogu dodati i terpenoidi, posebno monoterpenoidi, isparljive komponente etarskih ulja, za koje je primećeno da pokazuju inhibitorni efekat na klijanje i rast klijanaca drugih biljnih vrsta (Muller i Muller, 1964, Fisher, 1986., Muller, 1986, Abraham i sar., 2000, Romagni i sar., 2000, Singh i sar., 2002,2006a, 2006b, Nishida i sar., 2005).

Poslednjih godina raste interes za upotrebu prirodnih jedinjenja u kontroli rasta korovskih vrsta. Herbicidi, koji se u poljoprivrednoj praksi široko koriste za suzbijanje neželjenih korovskih biljaka, predstavljaju veliki problem za ljudsko zdravlje i životnu sredinu sa obzirom na činjenicu da uzrokuju poremećaj ekološkog balansa. Prirodna jedinjenja sa alelopatskim dejstvom uglavnom predstavljaju produkte sekundarnog metabolizma i nazivaju se alelohemikalije. Alelohemikalije su bezbednije od sintetičkih herbicida u prvom redu zato što su biorazgradive i imaju minimalan štetan uticaj na životnu sredinu (Topal i Kocaçalışkan, 2006).

Biljke oslobađaju alelohemikalije u okolnu sredinu na nekoliko načina. Isparljiva jedinjenja se oslobađaju sa površine listova u atmosferu, dok se neisparljive alelohemikalije izlučuju preko nadzemnih delova biljke, oslobađaju eksudacijom preko korena, ili dospevaju u životnu sredinu nakon raspadanja biljnih ostataka (*Singh* i sar., 2003, *Noguchi* i *Ino*, 2005). Alelohemikalije su prisutne u svim tkivima lista, stabla, korena, cveta, pupoljaka (*Weston* i *Duke*, 2003) i mogu imati štetno/inhibitorno dejstvo na rastenje i razviće biljnih vrsta u njihovom okruženju. U nekim slučajevima alelohemikalije mogu imati i stimulatívni efekat na klijanje semena, rastenje i razviće drugog učesnika alelopatske interakcije. Međutim, u većini slučajeva alelopatske interakcije su toksične, izazivaju alelopatski stres i u ekstremnim slučajevima smrt vrste na koju deluju alelohemikalije (*Weston* i *Duke*, 2003, *Mutlu* i *Atici*, 2009). Slično kao kod drugih vrsta stresa, *ROS* se oslobađaju i za vreme alelopatskog stresa (*Meloni* i sar., 2003, *Singh* i sar., 2006a, *Ding* i sar., 2007, *Mutlu* i sar., 2011).

#### 1.4.3.1. Monoterpenoidi kao alelohemikalije

Jedan od najpoznatijih i najviše ispitivanih primera alelopatije je takozvani „*Salvia* fenomen“ (*Müller*, 1964): vrsta *Salvia leucophylla* u Mediteranskom području utiče na karakterističan izgled vegetacije, koji se odlikuje pojavom da u krugu od tri metra oko jedinki pomenute vrste nema vegetacije, od trećeg do šestog metra se javljaju trave izmenjene morfologije i smanjenog rasta, dok se tek u krugu od šestog do desetog metra javljaju trave normalnog izgleda karakteristične za taj tip vegetacije. U listovima vrste *Salvia leucophylla* detektovano je prisustvo pet isparljivih monoterpenoida: kamfor, 1,8-cineol,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen i kamfen. U laboratorijskim uslovima je pokazano da, kada se pomenuti monoterpenoidi dodaju kao čiste supstance, dolazi do inhibicije klijanja testiranih semena i inhibicije rasta klijanaca. Najtoksičnije dejstvo su pokazali kamfor i 1,8-cineol, čije je prisustvo detektovano u atmosferi oko *S. leucophylla*.

Postoji jasna veza između strukture i funkcije monoterpenoida. Pokazano je da svi monoterpenoidi pokazuju manju ili veću alelopatsku aktivnost u zavisnosti od strukture. Tako aciklični alkoholi (nerol, geraniol, linalol), monociklični alkoholi (terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpinelol, borneol) i ketoni (karvon, kamfor, menton) imaju veći alelopatski potencijal od aldehida (limonen, terpinen,  $\alpha$  i  $\beta$  pinen) (*Angelini* i sar., 2003).

Male strukturne razlike mogu takođe značajno uticati na aktivnost bioaktivnih jedinjenja. Poređenjem alelopatskog potencijala 1,4-cineola i 1,8-cineola pokazano je da veće inhibitorno dejstvo na klijanje i rast klijanaca test vrsta ima 1,8-cineol. Sa obzirom da se oba monoterpenoida uglavnom javljaju zajedno, moguće je i njihovo sinergističko dejstvo u alelopatskim interakcijama (Romagni i sar., 1999). Takođe,  $\beta$ -pinen pokazuje značajan alelopatski potencijal dok je alelopatski potencijal  $\alpha$ -pinena znatno slabiji (Nishida i sar., 2005).

Poznato je da monoterpenoidi svoj fitotoksični efekat ispoljavaju tako što dovode do morfoloških i fizioloških promena kod biljaka na koje deluju. Oksidativni stres može biti jedna od osnovnih posledica negativnog delovanja alelohemikalija (Mutlu i sar., 2011). Singh i saradnici (2006a, 2009) su pokazali da monoterpenoidi iz etarskih ulja nekih alelopatskih biljaka uzrokuju nakupljanje  $H_2O_2$  u korovskim vrstama na koje deluju. Akumulacija  $H_2O_2$  u korovskim vrstama pojačava nivo lipidne peroksidacije, što dovodi do povećanja oksidativnog stresa u biljkama, a samim tim i do poremećaja pojedinih metaboličkih procesa u ćeliji. Peroksidacija nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima dovodi do stvaranja malondialdehida (MDA) koji je odgovoran za oštećenja ćelijskih membrana (Maness i sar., 1999, Xu i sar., 2006). Poznato je da  $H_2O_2$  ometa funkciju enzima koji sadrže -SH grupu, narušava fotosintetičku aktivnost u hloroplastima i usled toga dovodi do redukcije biljnog rasta (Takeda i sar., 1995). Među različitim ROS koje se proizvode u biljkama kao odgovor na stres,  $H_2O_2$  ima značajnu signalnu ulogu, u veoma malim koncentracijama može da zaštiti ćeliju obezbeđujući joj povećanu toleranciju na ponovni stres, dok u velikim koncentracijama izaziva ćelijska oštećenja (Stone i Jang, 2006). S obzirom da su monoterpenoidi lipofilna jedinjenja, postoje brojna tumačenja po kojima monoterpenoidi mogu da uđu u ćelije prolaskom kroz ćelijski zid i ćelijsku membranu, pri čemu dolazi do narušavanja ćelijske strukture, odnosno, do isticanja kalijuma iz ćelije i do otežanog disanja (Sikemma i sar., 1995, Batish i sar., 1997, Perillo i sar., 1994, Turina i Parillo 2003, Oracz i sar., 2007, Singh i sar., 2009).

Neki od poznatih mehanizama delovanja bio-herbicida su 1) inhibicija elektron transportnog lanca fotosistema II (PSII) u hloroplastima- vezujući se na mesto plastokinona u PSII bio-herbicidi zaustavljaju fotofosforilaciju inhibicijom ATPaze (Duke i Dayan, 2005); 2) inhibicija H<sup>+</sup>-ATPaze plazma membrane i tonoplasta (Cruz-Otega i sar., 1990), 3) inhibicija transporta elektrona u mitohondrijama (Abraham i sar., 2003); 4) sprečavanje formiranja mikroubula (Gordazlia i sar., 2000) što dovodi do inhibicije mitoze (Vaughan i Vaughn, 1988); 5) izazivanje nakupljanja lipidnih globula u citoplazmi, i sprečavanje proliferacije ćelija korena (Zunino i Zygodlo, 2004, Nishida i sar., 2005).

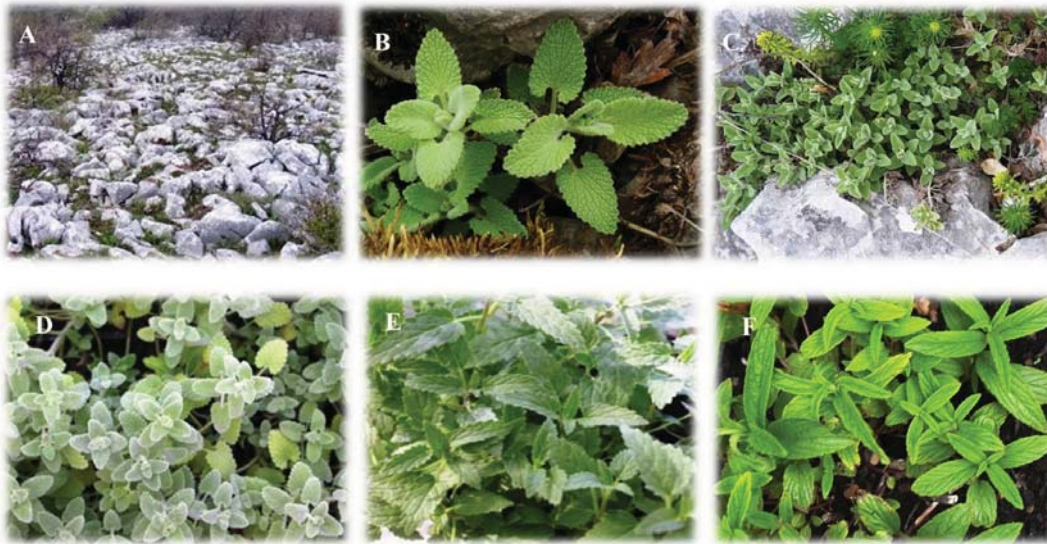
#### 1.4.3.2. Alelopatski potencijal vrsta roda *Nepeta*

Nepetalaktini kao glavne komponente etarskih ulja najvećeg broja vrsta roda *Nepeta* poseduju veliki alelopatski potencijal (Kobaisy i sar., 2005, Jahan i sar., 2006, Mutlu i sar., 2009, 2011, Mancini i sar., 2009, Hyun Eon i sar., 2011). U prirodnim uslovima je primećeno da oko jedinki nekih vrsta roda *Nepeta* postoji zona inhibicije u kojoj ne rastu druge vrste biljaka karakteristične za taj tip vegetacije. Zona inhibicije predstavlja važan ekološki kontekst za proučavanje alelopatije kod vrsta ovog roda (Mutlu i Atici, 2009). Primećeno je da isparljiva jedinjenja *N. fasseni*, među kojima su dominantna jedinjenja *trans,cis*-nepetalakton i *cis,trans*-nepetalakton, imaju jak inhibitorni efekat na rast klijanaca kresa (*Lepidium sativum* L.) (Hyun Eon i sar., 2006). Pokazano je takođe da 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -nepetalakton deluje fitotoksično na klijanje semena nekoliko korovskih vrsta, kao što su *Amaranthus retroflexus* L., *Bromus danthoniae* Trin., *Bromus intermedius* Guss., *Chenopodium album* L., *Cynodon dactylon* L., *Lactuca seriola* L., *Portulaca oleracea* L. (Mutlu i sar., 2011). Etarsko ulje *N. pannonica*, koje kao glavne komponente sadrži 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -nepetalakton i 1,8-cineol, inhibira klijanje nekih korovskih vrsta, i u potpunosti inhibira klijanje semena salate (Kobaisy i sar., 2005). Etarska ulja *N. nuda* ssp. *albiflora* i *N. curviflora* inhibiraju izduživanje radikule klijanaca *L. sativum* i *Raphanus sativus* L. (Mancini i sar., 2009).



### 1.5. Opšte odlike rtanjske metvice *N. rtanjensis* Diklić i Milojević, *N. sibirica* L. i *N. nervosa* Royle ex Bentham

Rod *Nepeta* jedan je od najvećih rodova u porodici *Lamiaceae*, pripada podporodici *Nepetoideae* i tribusu *Nepeteae* (Takhtajan, 2009). Rod obuhvata oko 300 zeljastih višegodišnjih, ređe jednogodišnjih vrsta, koje su rasprostranjene u većem delu centralne i južne Evrope, centralne i južne Azije, na Bliskom istoku i u nekim oblastima Afrike (Cantino i sar., 1992). Najveća raznovrsnost i bogatstvo vrsta iz roda *Nepeta* postoji u jugozapadnoj Aziji, pogotovo u Turskoj i Iranu gde je od 75 vrsta, ovog roda više od 53% endemično. Flora Evrope opisuje 24 vrste roda *Nepeta*, koje su pretežno rasprostranjene u centralnoj i južnoj Evropi, naročito oko Sredozemnog mora (Turner, 1976). U flori Srbije rod *Nepeta* prisutan je sa tri vrste: *N. cataria* L., *N. nuda* L. (Diklić, 1972) i *N. rtanjensis* Diklić i Milojević.



**Slika 12.** A-C) Prirodno stanište *N. rtanjensis* lokalitet Javor (planina Rtanj u jugoistočnoj Srbiji); D) *N. rtanjensis* E) *N. sibirica* F) *N. nervosa* gajene u uslovima staklare.

#### 1.5.1. *Nepeta rtanjensis* Dikić i Milojević

*N. rtanjensis* je prvi put zabeležena u severoistočnoj Srbiji, na južnim padinama planine Rtanj. Na Slici 12 A B i C prikazano je prirodno stanište rtanjske metvice, dok je na Slici 12 D prikazana rtanjska metvica iz uslova staklenika. Kao nova biljna vrsta za nauku opisana je 1976. godine od strane Nikole Diklića i Bojane Milojević.

Ova vrsta je u narodu poznata kao rtanjska metvica. *N. rtanjensis* pripada mediteransko-submediteranskom / istočnomediteranskom / zapadnomezijskom / rtanjskom flornom elementu. Srodna je taksonima *N. camphorata*, *N. heldreichii*, *N. parnassica*, *N. spruneri*, *N. sibthorpii* i *N. dirphyra*, koje spadaju u sekciju *Pycnonepeta* i *N. sibthorpii* kompleks. Centar njihovog rasprostranjenja je na krajnjem jugu Balkanskog poluostrva. Jako udaljen i izdvojen areal *N. rtanjensis*, severno od centra rasprostranjenja ostalih vrsta agregata u Mediteranu, ukazuje na reliktni karakter ove vrste (Diklić, 1999). Stanište *N. rtanjensis* su otvoreni, zasenjeni i kompaktni kamenjari na visini od 650 do 850 m nadmorske visine. *N. rtanjensis* je uvršćena u Crvenu Knjigu Flore Srbije i to u kategoriju krajnje ugroženih taksona (CR B<sub>2c</sub>), što ukazuje na opasnost da u neposrednoj budućnosti dođe do njenog iščezavanja iz prirode. Vrsta je kao prirodna retkost zaštićena i zakonom (Sl. Gl. Srbije br. 66/91, 83/92/ i 50/93). *N. rtanjensis* je višegodišnji polužbun, čije je stablo tupo četvorostrano, visoko do 65 cm. Listovi su sa kratkom drškom, izduženo jajasti ili jajasti, pri osnovi srčasti, tupo nazubljeni. Značajna morfološka osobina *N. rtanjensis* je indumentum na stablu i naročito na listovima. Čine ga gusto isprepletane različite višecelijske mehaničke dlake i dobro razvijeno egzogeno sekretorno tkivo (žlezdane dlake i sedeće uljane žlezde, prvenstveno na epidermisu naličja lista). Razlikuju se dva tipa dlaka: dugačke, 0,2-1,5 mm, višecelijske sa žlezdanim vrhom ili bez njega i kratke, 0,01-0,08 mm, papilozne koje su vrlo retke u indumentumu (Hussain, 1989). Do 35 cvetova je zbijeno u 4-11 pršljenova. Brakteje su brojne, izduženo lancetaste, gusto prekrivene kratkim dlakama. Čašica je valjkasta, sa 15 nerava, čašičnih zubaca ima pet i svi su jednake dužine. Krunica je beličasta sa sitnim ljubičastim pegama. Cveta od juna do jula, tip oprašivanja je entomofilija. Plodonosi u avgustu i septembru. Plod je bradavičasta orašica jajastog oblika. Rasejavanje je autohorno. Razmnožava se semenima i vegetativno iz odrvenelih donjih delova stabljike.

U etarskom ulju *N. rtanjensis* kao dominantno jedinjenje prisutan je *trans,cis*-stereoizomer nepetalaktona dok se *cis,trans*-nepetalakton nalazi samo u tragovima (Chalchat i sar., 2000, Stojanović i sar., 2005). Etarsko ulje vrste *N. rtanjensis* pokazalo je izrazito antibakterijsko dejstvo na sojeve *Staphylococcus aureus* (Jovanović-Durđević, 1986) i može se primeniti putem inhalacije u lečenju infekcija gornjih disajnih puteva izazvanih ovom bakterijom (Jančić i sar., 1995).

Kasnije je pokazano antibaktrijsko dejstvo etarskog ulja *N. rtanjensis* i na druge bakterijske sojeve kao što su *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Echerichia coli* i *Aspergillus niger* (Stojanović i sar., 2005). Etarsko ulje rtanjske metvice pokazuje i jako fungicidno dejstvo (Ljaljević-Grbić i sar., 2007, 2008, 2011a, 2011b). Nedavno je pokazano antifungalno dejstvo *N. rtanjensis* na humanu patogenu vrstu *Bipolaris spicifera* (Ljaljević-Grbić i sar., 2011b).

### 1.5.2. *Nepeta sibirica* L.

*N. sibirica* je endemična vrsta centralne Azije, Mongolije i južnog Sibira (Letchamo i sar. 2005). Na slici **12 E** prikazana je *N. sibirica* iz uslova staklenika. *N. sibirica* je zeljasta višegodišnja biljka sa velikim brojem izdanaka dužine do 40 cm. Listovi su na kratkim lisnim drškama, trouglasti, sa izraženom nervaturom i nazubljenih ivica. Cvasti se nalaze na vršnom delu stabljike, čašični listići su trouglasti zašiljenog vrha i pokriveni su žlezdanim dlakama. Krunični listići su plave boje, proređeno pokriveni dlakama (Shu, 1994).

Oskudna fitohemijska istraživanja vrste *N. sibirica* ukazuju na to da je dominantna komponenta etarskog ulja *cis,trans*-stereoizomer nepetalaktona (Letchamo i sar., 2005, de Pooter i sar., 2006). Veoma su malobrojni podaci o biološkoj aktivnosti *N. sibirica*. Jedino je opisano antimikrobno dejstvo metanolnog ekstrakta *N. sibirica* (Nestorović i sar., 2010).

### 1.5.3. *Nepeta nervosa* Royle ex Bentham

*N. nervosa* je endemična vrsta Kašmira (Blatter, 1928) koja nastanjuje osunčana ili delimično zasenčena mesta. Na slici **12 F** prikazana je *N. nervosa* iz uslova staklenika. Botaničko ime je dobila zbog izraženih lisnih nerava. *N. nervosa* je višegodišnji polužbun, visine do 60 cm. Na kratkim lisnim drškama su dugački listovi nazubljenih ivica i zašiljenog vrha, dok je površina lista duboko izborana. Cvasti se nalaze na vršnom delu stabljike, krunica je ljubičasto-plave boje. U prirodi se mogu naći i forme sa žutim cvetovima (Shu, 1994). *N. nervosa* spada u grupu *Nepeta* koje ne poseduju hemotaksonomski indikator –nepetalakton. Podaci o biološkoj aktivnosti ove vrste nisu dostupni u naučnoj literaturi. Jedino je opisano antimikrobno dejstvo metanolnog ekstrakta *N. sibirica* (Nestorović i sar., 2010), a ti rezultati su rezultat ove disertacije.

## 2. CILJEVI RADA

Glavni cilj ovog rada je ispitivanje biološke aktivnosti *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* koje su u tom pogledu nedovoljno istražene i koje se razlikuju u kvalitativnom i kvantitativnom sadržaju glavnih grupa sekundarnih metabolita (terpenoida i fenolnih jedinjenja). Istraživanja obuhvataju:

- ☞ uspostavljanje *in vitro* sistema za propagaciju endemičnih vrsta *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, s ciljem obezbeđivanja biljnog materijala za potrebe eksperimenata;
- ☞ fitohemijsku karakterizaciju *in vitro* gajenih izdanaka tri vrste roda *Nepeta*, koja uključuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu terpenoidnih i fenolnih jedinjenja u metanolnim i dihlor-metanskim ekstraktima, kao i analize isparljivih jedinjenja u atmosferi posude za *in vitro* gajenje biljaka;
- ☞ ispitivanje antioksidativnog dejstva metanolnih ekstrakata *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, etarskih ulja *N. rtanjensis* i *N. cataria*, kao i dominantnih fenolnih jedinjenja (ruzmarinska kiselina i hlorogena kiselina), u seriji testova kao što su DPPH, ABTS i FRAP;
- ☞ ispitivanje antimikrobnog dejstva metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Nepeta* na 8 vrsta bakterija i 8 vrsta gljiva;
- ☞ uspostavljanje eksperimentalnog model sistema ko-kulture *in vitro* vrsta roda *Nepeta* i test vrste *Lepidium sativum* za izučavanje alelopatskog potencijala isparljivih terpenoidnih jedinjenja
- ☞ ispitivanje alelopatskog potencijala *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* kao i rasvetljavanje mehanizma delovanja alelohemikalija na nivou enzimskih komponenti antioksidativnog sistema (superoksid dismutaze, peroksidaze, katalaze i polifenol oksidaze).
- ☞ izučavanje alelopatskog efekta etarskih ulja *N. rtanjensis* i *N. cataria*, kao i  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena, na klijanje odabranih korovskih vrsta i nekoliko poljoprivrednih kultura, s ciljem ispitivanja mogućnosti njihovog korišćenja u poljoprivrednoj praksi kao bioherbicida

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Biljni materijal

Semena *Nepeta rtanjensis* Diklić i Milojević su sakupljena 2004. godine sa biljaka odgajenih na eksperimentalnoj parceli Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. Semena su čuvana na  $-20^{\circ}\text{C}$  do trenutka upotrebe. Semena *N. sibirica* L. i *N. nervosa* Royle ex Bentham su dobijena od botaničke bašte u Esenu, Nemačka.

##### 3.1.1. Uspostavljanje *in vitro*kulture tri vrste roda *Nepeta*

Površinska sterilizacija je izvršena tretiranjem semena 20% rastvorom komercijalnog izbeljivača (*Domestos*, *Unilever Magyarorszag Kft.*, Mađarska) koji sadrži 5% aktivne supstance Na-hipohlorita, tokom 10 minuta. Semena su potom pet puta isprana sterilnom dejonizovanom vodom. Klijanje semena je indukovano 1 mM rastvorom  $\text{GA}_3$  koji je sadržao i  $500\text{ mg l}^{-1}$  nistatina tokom 24 sata. Nakon ispiranja sterilnom dejonizovanom vodom, površinski sterilisana semena su prebačena na  $\frac{1}{2}$  MS hranljivu podlogu (*Murashige i Skoog*, 1962) koja je sadržala  $100\text{ mg l}^{-1}$  myo-inozitola,  $20\text{ g l}^{-1}$  saharoze i  $7\text{ g l}^{-1}$  agara (Torlak, Beograd, Srbija). *pH* vrednost hranljive podloge je podešena na 5.8 pre sterilizacije na  $114^{\circ}\text{C}$  tokom 25 minuta.

Biljke su rasle u staklenim teglama zapremine 350 ml, sa providnim polikarbonatnim zatvaračima i gajene u sobi za rast kultura u uslovima dugog dana (16/8 sati svetlo/mrak), na temperaturi od  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , i relativnoj vlažnosti vazduha od 60-70%. Pasažiranje je vršeno svake četvrte nedelje, do trenutka kada je obezbeđena dovoljna količina biljnog materijala za potrebe eksperimenata.

Četiri nedelje od postavke eksperimenta mereni su sledeći parametri: dužina nadzemnog dela izdanka, dužina korena, broj nodusa i aksilarnih pupoljaka po izdanku, procenat ožiljavanja, sveža i suva masa izdanaka. Biljni materijal je osušen na sobnoj temperaturi i čuvan u papirnim kesama do trenutka upotrebe.

### 3.1.2. *In vitro* ko-kultivacija vrste *Lepidium sativum* sa tri vrste roda *Nepeta*

Za potrebe analize alelopatskog potencijala tri vrste roda *Nepeta*, kao test vrsta korišćen je kres (*Lepidium sativum* L.). Semena kresa su komercijalno nabavljena (*Royal Sluis*®, *Magrovet*, Mađarska).

Eksperimentalna postavka: Četiri nedelje stari izdanci *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa in vitro* su ko-kultivisani sa *L. sativum*. Svaka eksperimentalna postavka je sadržala od 1 do 9 jedinki neke od vrsta roda *Nepeta* i po trideset semena *L. sativum*. Narednih pet dana je praćen efekat isparljivih jedinjenja tri vrste roda *Nepeta* na klijanje i rast klijanaca kresa. S obzirom da je najveći efekat na klijanje i rast klijanaca uočen prilikom ko-kultivisanja sa po devet jedinki *Nepeta sp.*, u daljim eksperimentima su praćene samo te ko-kulture. U drugom tipu eksperimenta su korišćena prethodno isključena semena, tj. 3 dana stari klijaneci kresa, koji su ko-kultivisani sa po 9 jedinki *N. rtanjensis*, *N. sibirica* ili *N. nervosa*, kako bi se razdvojio efekat isparljivih jedinjenja u fazi klijanja semena i onog u ranim fazama razvića klijanaca.

### 3.1.3. Ispitivanje alelopatskog potencijala etarskog ulja *N. rtanjensis*, *N. cataria*, $\alpha$ -pinena i $\beta$ -pinena

Ispitan je alelopatski potencijal etarskog ulja *N. rtanjensis* koje sadrži približno 73% *trans,cis*-nepetalaktona i etarskog ulja *N. cataria* koje sadrži 90% *cis,trans*-nepetalaktona, s ciljem da se utvrdi koji izomer nepetalaktona ima jači alelopatski efekat. Takođe je ispitan i alelopatski efekat standarda monoterpenoida:  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena (*Haarman* i *Reimer*, Južna Afrika). Etarsko ulje *N. cataria* dobijeno je ljubaznošću dr *Michael Birkett* (*Biological Chemistry and Crop Protection Department, Rothamsted Research, Harpenden, Herts.*, Velika Britanija). U ovoj analizi korišćena su semena *Lactuca sativa* L. sorta „Majska kraljica“ (Bioprodukt, Srbija) koja su komercijalno nabavljena. Semena *Lotus corniculatus* L. sorta „Bokor“ su dobijena iz Centra za poljoprivredna i tehnološka istraživanja (Zaječar, Srbija). Semena *Brassica napus* L., *Stellaria media* (L.) Vill. i *Rumex crispus* L. su sakupljena 2010. godine na širem području Beograda, i dobijena su iz Instituta za pesticide (Zemun, Srbija).

Semena *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ekotip Kolumbija, koja su dobijena od *European Arabidopsis Stock Centre*, isključavana su i gajena u stakleniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Semena koja su korišćena u eksperimentu su sakupljena sa biljaka gajenih u stakleniku 2010. godine. Sva semena su čuvana u papirnim kesama, na sobnoj temperaturi do trenutka upotrebe.

Eksperimentalna postavka: Etarska ulja i standardi su razblaženi u metanolu (*AppliChem, Cheshire, SAD*) do finalne koncentracije aktivnih komponenti od 0,13%, 0,26%, 0,53%, 1,07%, 2,15% i 4,3%. Po 15 ml ½ MS hranljive podloge razliveno je na pola sterilne Petri kutije (prečnika 9 cm), dok je u drugoj polovini postavljen sterilni filter papir (1,5 cm x 1,5 cm) koji nije bio u kontaktu sa hranljivom podlogom. Na filter papire je dodato po 30 µl metanolnog rastvora ispitivanog jedinjenja, ili čistog metanola koji je korišćen kao kontrola. Svaka Petri kutija sadržala je po 20 sterilisanih semena. Petri kutije sa biljnim materijalom su hermetički zatvarane parafilmom (*Bemis Flexible Packaging, Neenah, SAD*) i gajene u sobi za rast kultura u uslovima dugog dana, sa izuzetkom semena *A. thaliana* koja su po postavci eksperimenta bila u mraku na 4°C tokom tri dana, a zatim prebačena u uslove dugog dana do kraja eksperimenata. Broj prokljalih semena je zabeležen najranije dva a najkasnije devet dana od početka eksperimenta, u zavisnosti od vrste semena.

### 3.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajuća elektronska mikroskopija omogućava istraživanje finih detalja posmatranih struktura. SEM nudi mogućnost uveličanja od 10 do čak 500 000 puta, a skeniranjem preparata slika se oblikuje otkrivanjem elektrona koji su se odbili o spoljašnju površinu posmatranog preparata. Na skenirajućem elektronskom mikroskopu (*JSM-6390, JEOL, SAD*) bez prethodne fiksacije posmatrano je lice lista tri vrste roda *Nepeta* koje su gajene u uslovima *in vitro*, s ciljem analize prisustva i strukture žlezdanih dlaka. Takođe, posmatrani su i klijanci *L. sativum* stari 18 i 24 sata.

### 3.3. Fitohemijske analize *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* gajenih *in vitro*

#### 3.3.1. Analiza isparljivih jedinjenja u kulturi *in vitro* tri vrste roda *Nepeta*

##### 3.3.1.1. „Headspace“ GC-MS kvalitativna analiza sadržaja isparljivih jedinjenja

Sakupljanje isparljivih jedinjenja tri vrste roda *Nepeta* koje su rasle u uslovima *in vitro* urađeno je čeličnim *Tenax* kolonama (*Ultra*, *Markes*, *Lantrisant*, Velika Britanija), dimenzija 89 mm x 66,4 mm. Priprema kolona za analize urađena je zagrevanjem na 280°C tokom 40 minuta, na struji azota od 20 psi (*TC 20 multi-tube conditioner*, *Markes International Limited*, Velika Britanija). Izdanci tri vrste roda *Nepeta* su postavljeni u male boce koje sadrže vodu kako bi se izbegla njihova dehidracija, i potom ubačeni u staklene tegle zapremine 2 l. Sakupljanje isparljivih jedinjenja u *Tenax* kolonama je izvršeno tokom dva sata, uz konstantan protok vazduha kroz tegle od 90 ml min<sup>-1</sup>. Nakon dva sata, a neposredno pre GC-MS analize, kolone su osušene tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi, na struji azota od 30 psi. GC-MS analiza je urađena na gasnom hromatografu *Termo Trace GC Ultra* koji je povezan sa masenim spektrometrom (*ThermoFisher Scientific*, SAD), na *ZB-5MSI* koloni dimenzija 30 m x 60,25 mm i debljine filma 1,00 mm (*Zebron*, *Phenomenex*). Helijum je korišćen kao noseći gas a brzina protoka je podešena na 50 ml min<sup>-1</sup>. Temperatura injektora je postepeno povećavana od 40°C do 280°C, brzinom 10°C u minuti i potom održavana na 280°C. Skenirane su mase u opsegu *m/z* 33 do 280, sa vremenom skeniranja od 4,2 scan s<sup>-1</sup>. Identifikacija jedinjenja urađena je masenospektrofotometrijski i preko Kovačevih indeksa, poređenjem sa bazama masenih spektara (*NIST/Wiley*) i raspoloživih literaturnih podataka. Za upravljanje instrumentom i analizu podataka korišten je *Xcalibur softwer* (*ThermoFisher Scientific*, SAD).



### 3.3.1.2. PTR-MS (eng. Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry) kvantitativna analiza

Detekcija isparljivih jedinjenja u atmosferi, na osnovu njihovih masa i relativna kvantifikacija na osnovu jačine signala, urađena je na standardnom PTR-MS uređaju (*Ionicon, Analytik, Innsbruck, Austria*), koji nudi mogućnost detekcije isparljivih jedinjenja u veoma malim koncentracijama (prag detekcije je  $30 \text{ pptv} = 30 \times 10^{-12} \text{ mol/mol}$ ), bez pripreme uzoraka i hromatografije. Isparljiva jedinjenja su jonizovana protonom iz  $\text{H}_3\text{O}^+$ , tako da maseni spektrometar detektuje molekulsku masu u pozitivnom modu  $[\text{M}+1]^+$ .

Analiza koncentracije nepetalaktona ( $m/z$  167) u atmosferi posuda u kojima su gajene *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* izvršeno je tokom 20 ciklusa, na svakih 10 sekundi. Pritisak u reakcionoj komori je podešen na 2,19 mbar, a u detekcionoj komori na  $3,5 \times 10^{-5}$  mbar. Zagrevanje inleta i drift cevi vršeno je na  $60^\circ\text{C}$ , dok je odbrojavanje  $\text{H}_3\text{O}^+$  jona bilo  $3,37 \times 10^6 \text{ cps}$ .

### 3.3.2. Fitohemijska karakterizacija isparljivih jedinjenja u metanolnim i dihlor- metanskim ekstraktima izdanaka *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* gajenih *in vitro*

Priprema metanolnih ekstrakata tri vrste roda *Nepeta*: Nadzemni delovi tri vrste roda *Nepeta* koje su gajene u uslovima *in vitro*, osušeni su na temperaturi od  $30^\circ\text{C}$ , do konstantne mase. Nakon mehaničkog usitnjavanja biljnog materijala, odmereno je po 250 mg svakog uzorka. Uzorci, kojima je dodato po 10  $\mu\text{l}$  internog standarda geraniola (*Harmman Reimer, Nemačka*), ekstrahovani su sonifikacijom u trajanju od 20 minuta, u 10 ml 99,8% rastvora metanola (*AppliChem, Cheshire, CT*), posle čega su profiltrirani u normalne sudove zapremine 10 ml. Nakon podešavanja zapremine uzorci su profiltrirani kroz 0,2  $\mu\text{m}$  celulozne filtere (*Agilent Technologies, Santa Clara, SAD*), i čuvani na  $-20^\circ\text{C}$  do trenutka analiza. Za potrebe UHPLC-DAD-MS/MS analize, uzorci su pripremljeni po istom protokolu, ali bez dodatka internog standarda.

Priprema dihlor-metanskih ekstrakata tri vrste roda *Nepeta*: Nadzemni delovi tri vrste roda *Nepeta* (100 mg) su usitnjeni u tečnom azotu i ekstrahovani u 600  $\mu\text{l}$  dihlor-metana ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), koji je sadržao 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  *cis*-nerolidola (*Sigma-Aldrich*, Nemačka) kao internog standarda. Nakon 20 minuta sonifikacije, uzorci su centrifugirani na 3000 g tokom 20 minuta. Supernatant je dehidratiran anhidrovanim natrijum sulfatom ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) i tako dobijen filtrat je korišćen za *GC-MS* analizu. Uzorci su čuvani na  $-20^\circ\text{C}$  do trenutka analize.

**3.3.2.1. GC-MS i GC-FID analiza metanolnih ekstrakata i etarskog ulja *N. rtanjensis* (Gasna hromatografija sa masenom spektrometijom i gasna hromatografija sa plameno jonizujućim detektorom eng. *Gas Chromatography Flame Ionization Detector*)**

Izolacija etarskih ulja: Biljni material za potrebe izolacije etarskih ulja vrste *N. rtanjensis* je prikupljen 2009. godine na eksperimentalnoj parceli Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu. Nadzemni delovi biljaka u fazi cvetanja su osušeni do konstantne mase i iskorišćeni za izolaciju etarskih ulja metodom hidrodestilacije tokom 2 sata u *Clevenger* aparaturi, kao što je ranije opisano (*Ljaljević Grbić* i sar., 2008).

Kvalitativna i kvantitativna analiza uzoraka metanolnih ekstrakata izdanaka vrsta *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* kao i etarskog ulja *N. rtanjensis* vršena je gasnohromatografski uz korišćenje dva tipa detektora. *GC-FID* analiza metanolnih ekstrakata urađena je na *HP-5890 Series II* gasnom hromatografu (*Hewlett-Packard*, SAD), koji je opremljen „*split-splitless*“ injektorom povezanim sa *HP-5* kolonom (25 m x 0,32 mm, debljine filma 0,52  $\mu\text{m}$ ) i plameno jonizujući detektorom (*FID*). Kao noseći gas korišćen je vodonik, a brzina protoka je bila 1 ml u minutu. Temperatura injektora iznosila je  $250^\circ\text{C}$ , detektora  $300^\circ\text{C}$ , dok je temperatura kolone rasla u linearnom režimu temperaturnog programiranja od  $40$ - $260^\circ\text{C}$  (u intervalima  $4^\circ\text{C}$  u minuti), a zatim održavana izotermiski tokom narednih 10 minuta. Isti analitički uslovi korišćeni su i za potrebe *GC/MS* analize rađene na *Hewlett-Packard HP-G1800C Series II GCD* analitičkom sistemu, s tim što je korišćena *HP-5MS* kolona (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ) i što je kao noseći gas korišćen helijum.

Temperatura transfer linije iznosila je 260°C. Maseni spektri snimani su u *EI* režimu (70 eV), u opsegu *m/z* 40-400. U svim slučajevima metanolni rastvori (1 µl) injektirani su u *splitless* režimu rada inleta. Identifikacija pojedinačnih komponenti vršena je masenospektrometrijski i preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (*NIST/Wiley*), različitih načina pretrage (*PBM/NIST/AMDIS*) i raspoloživih literaturnih podataka (*Adams*). Procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (*GC/FID*) uzeti su kao osnova za kvantifikaciju podataka.

### **3.3.2.2. GC-MS analiza (Gasna hromatografija sa masenim spektrometrom eng. *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) dihlor-metanskih ekstrakata**

Analiza dihlor-metanskih ekstrakata je urađena na gasnom hromatografu 7809A (*Agilent*, SAD), na ZB-5 koloni dimenzija 30 m x 0,25 mm, i debljine filma 0,25 µm (*Phenomenex*, SAD). Helijum je korišćen kao noseći gas a brzina protoka je podešena na 1 ml u minutu. Temperatura injektora je postepeno povećavana brzinom od 10°C u minutu i održavana je na 250°C. Gasni hromatograf je bio direktno povezan sa masenim detektorom (5975C, *Agilent*, SAD). Identifikacija pojedinačnih komponenti vršena je masenospektrofotometrijski i preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (*NIST/Wiley*), različitih načina pretrage (*PBM/NIST/AMDIS*) i raspoloživih literaturnih podataka.

### **3.3.2.3. HPLC-UV i HPLC-MS analiza (Tečna hromatografija pod visokim pritiskom sa UV detekcijom i masenom spektrofotometrijom) sadržaja nepetalaktona u metanolnim ekstraktima**

Analiza sadržaja monotrpenoida, *trans,cis*-nepetalaktona i *cis,trans*-nepetalaktona u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis*, *N. nervosa* i *N. sibirica* urađena je po izmenjenoj metodi koju su prvobitno opisali *Ganzera* i sar. (2001). Metodu sa izmenama su opisali *Mišić* i sar., 2005a. HPLC analize su urađene na *Hewlett Packard* HPLC sistemu, model 1100 sa UV detektorom. Korišćena je *Hypersil BDS-C18* kolona, 125 x 2 mm sa veličinom partikula od 5 µm. Identifikacija jedinjenja je urađena pomoću *HP Chemstation* hromatografskog softvera (*Palo Alto*, SAD).

Standardni rastvori su pripremljeni rastvaranjem etarskog ulja *N. ratanjensis* koje je sadržalo 79,89% *trans,cis*-nepetalaktona i 6,3% *cis,trans*-nepetalaktona u metanolu (10  $\mu$ l/10ml metanola). Drugi kalibracioni nivoi su pripremljeni daljim razblaživanjem rastvora u metanolu do željenih koncentracija. U cilju potvrde identifikacije stereoizomera nepetalaktona urađena je *HPLC-MS* analiza metanolnih ekstrakata, korišćenjem izmenjene metode koju su prvobitno opisali Wang i sar. (2007). Analize su urađene na *Waters Breeze HPLC* sistemu (*Waters, Milford, SAD*) sa *EMD 1000* masenim detektorom, u pozitivnom *ESI* modu. Signali su snimljeni u *SIM* (eng. *Single Ion Mode*) modalitetu za nepetalakton  $m/z$   $[M+H]^+$  167, dok je *MS* skeniranje jona vršeno u opsegu od 100 do 400 *amu*. Korišćena je kolona *Waters Xterra MS C-18* dijametra 2,1 x 50 *mm* (dimenzija pora 3,5  $\mu$ m). Kao mobilna faza korišćeni su 0,1% mravlja kiselina i 30% acetonitril (*HPLC* čistoće, *J.T. Baker, SAD*). Mravlja kiselina (A) i acetonitril (B) su eluirani gradijentom prema sledećoj šemi: 30% B (0 minuta), 40% B (2 minuta), 50% B (5 minuta), 60% B (10 minuta), 70% B (20 minuta). Identifikacija pikova je urađena pomoću *Waters Empower 2* softvera (*Waters, Milford, SAD*), na osnovu standarda.

#### **3.3.2.4. UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS analiza (Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom sa UV detekcijom i MS/MS masenom spektrofotometrijom) nepetalaktona u metanolnim ekstraktima**

Hromatografsko razdvajanje metanolnih ekstrakata je urađeno na *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* sistemu (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*) u čijem se sklopu nalazi binarna pumpa, vakuum degaser, termostat za kolone, auto-sempler i *UV/VIS* detektor (*DAD*, eng. *diode array detector*). *UHPLC* sistem je konfigurisan sa *triple-quadrupole* masenim spektrofotometrom (*TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*) sa elektron sprej jonizacijom (*HESI*, eng. *heated electro spray ionization*). Hromatografsko razdvajanje je urađeno na *Hypersil gold C18* koloni dimenzija 50 x 2,1 *mm*, sa česticama veličine 1,9  $\mu$ m (*Thermo Fisher Scientific, SAD*).

Mobilna faza se sastojala od 0,1% rastvora mravlje kiseline (A) i acetonitrila (B), a uzorci su eluirani prema sledećem gradijentu: 5-20% B u prvih 3 minuta; 20-40% B od 3 do 5 minuta, 40-50% B od 5 do 7,5 minuta, 50-60% B u periodu od 7,5-8,5 minuta, 60-95% B od 8,5 do 10,5 minuta, 95% B do 11,5 minuta, 95% do 5% B od 11,5 do 12 minuta, i na kraju 5% B do 15 minuta. Protok je podešen na  $0,4 \text{ ml min}^{-1}$  a talasne dužine na 225, 260 i 320 nm. Sve analize su urađene korišćenjem rastvora MS kvaliteta (Fisher Scientific, Leics, Velika Britanija). Kolona je termostatorana na  $30^{\circ}\text{C}$ , dok je injekciona zapremina bila 2  $\mu\text{l}$ . Za kontrolu UHPLC instrumenta korišćen je Chromeleon Xpress softver (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka).

Temperatura jonske probe (eng. *vaporizer temperature*) masenog spektrofotometra podešena je na  $350^{\circ}\text{C}$ . HESI proba je podešena na sledeće parametre: voltaža 4000 V, pritisak nosećeg gasa ( $\text{N}_2$ ) 50 AU (arbitrarne jedinice; eng. *arbitrary units*), pritisak gasa u jonskom izvoru 0 AU, pritisak auksilarnog gasa 20 AU, temperatura kapilare  $270^{\circ}\text{C}$ , podešavanje jonskih sočiva 0 V. Podaci dobijeni na masenom spektrofotometru su praćeni u pozitivnom modalitetu u opsegu  $m/z$  od 100 do 1000.

U eksperimentima fragmentacije, disocijacija molekula je indukovana kolizijom (CID, eng. *collision-induced dissociation*), pri čemu je energija kolizione ćelije podešena na 30 eV. U PIS (eng. *product ion scanning*) eksperimentima, MS/MS produkt joni su dobijeni disocijacijom odabranih jona prekursora u kolizionoj ćeliji triple-quadrupole masenog spektrofotometra (Q2), a njihove mase su analizirane u Q3 kvadrupolu instrumenta. U NLS (eng. *neutral loss scanning*) eksperimentima Q1 i Q3 kvadrupoli zajedno skeniraju parove jona koji se razlikuju u karakterističnim neutralnim masama koje se ne jonizuju i usled toga ih nije moguće detektovati kvadrupolima. SRM (eng. *selected reaction monitoring*) je najosetljiviji tip analize korišćenog instrumenta koji pokazuje najveću specifičnost za analizirano jedinjenje, i zbog toga se najčešće koristi za apsolutnu kvantifikaciju. Mehanizam SRM eksperimenta se zasniva na odabiru predefinisanih masenih fragmenata, tj. produkt-jona, koji pokazuju najveći intenzitet u PIS eksperimentu. Xcalibur softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu instrumenta, kao i za prikupljanje i obradu podataka.

*Cis,trans*-nepetalakton i *trans,cis*-nepetalakton su identifikovani na osnovu njihovih UV, MS i MS/MS spektara, pri čemu je kao standard korišćeno etarsko ulje *N. cataria* sa unapred utvrđenim sadržajem oba izomera nepetalaktona (poklon prof. dr Bikett, Harpenden Research, Velika Britanija). Standardi su pripremljeni rastvaranjem etarskog ulja u metanolu, u odnosu 1:200 (v:v). Ostali kalibracioni nivoi su dobijeni daljim razblaživanjem stok rastvora do 1:2000 (v:v). Linerana regresiona analiza kalibracionih kriva je pokazala odličnu linearnost, uz korelacione koeficijente od  $r=0.9753$ ,  $p<0.001$  za *cis,trans*-nepetalakton i  $r=0.9977$ ,  $p<0.001$  za *trans,cis*-nepetalakton.

Kvantifikacija navedenih monoterpenoida u uzorcima je urađena na osnovu površine pikova u SRM eksperimentu. Rezultati su predstavljeni kao  $\mu\text{g}$  u 100 mg sveže mase uzorka ( $\mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1}$ ).

### **3.3.3. Fitohemijaska karakterizacija fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima izdanaka *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, kao i klijanaca *Lepidium sativum* gajenih *in vitro***

Priprema metanolnog ekstrakta *L. sativum*: Klijaneci kresa (*Lepidium sativum* L.) stari od jednog do pet dana, koji su rasli u kokulturi sa *N. rtanjensis*, *N. nervosa* ili *N. sibirica*, ekstrahovani su u 99,8% metanolu (*AppliChem, Cheshire, CT*) (1:10 w/v), tokom 20 minuta, uz sonifikaciju. Ekstrakti su centrifugirani 10 minuta na 10000 g pri temperaturi od +4°C. Supernatant je profiltriran (0,2  $\mu\text{m}$  celulozne filtere *Agilent Technologies, Santa Clara, SAD*), alikvotiran i čuvan na -20°C do trenutka upotrebe.

**3.3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje količine ukupnih slobodnih fenola** Ukupni slobodni fenoli u metanolnim ekstraktima *Nepeta*, kao i u metanolnim ekstraktima *L. sativum* su određeni spektrofotometrijski, korišćenjem Folin-Ciocalteu metode (*Feldman i Hanks, 1968*). Metoda se zasniva na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon, koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (fenol-MoW<sub>11</sub>O<sub>40</sub>)<sup>-4</sup>. U 475  $\mu\text{l}$  5% rastvora natrijum karbonata (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) i 475  $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteu reagensa (*Sigma Aldrich, SAD*) dodato je 50  $\mu\text{l}$  uzorka, nakon čega je sledilo inkubiranje u trajanju od 1

sata u mraku, na sobnoj temperaturi. Apsorbanca uzoraka je očitavana na 724 nm (*HP Agilent 8453 Spectrophotometer, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD*), sa po tri ponavljanja po uzorku. Kao standard je korišćena galna kiselina (*Sigma Aldrich, Nemačka*). Količina ukupnih slobodnih fenola izražena je u mmol ekvivalentima galne kiseline (*EGA*) po gramu suve mase uzorka za vrste roda *Nepeta* ili sveže mase uzorka za *L. sativum* (mmol EGA g<sup>-1</sup>).

**3.3.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje količine ukupnih flavonoida** Ukupni flavonoidi u metanolnim ekstraktima *Nepeta* kao i u metanolnim ekstraktima *Lepidium sativum* su određeni spektrofotometrijski, po metodi koju su opisali Karadeniz i sar., (2005), sa malim izmenama. 100 µl biljnog ekstrakta i 550 µl ddH<sub>2</sub>O je pomešano sa 40µl 5% kalijum nitrita (KNO<sub>2</sub>). Smeša je inkubirana 6 minuta na sobnoj temperaturi, zatim je dodato 70 µl aluminijum-hlorid heksa-hidrata (AlCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O). Posle 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi i dodavanja 240 µl 1 M rastvora natrijum hidroksida (NaOH) očitana je apsorbanca uzorka na 510 nm, po tri ponavljanja za svaki uzorak. Koncentracija ukupnih flavonoida za svaki uzorak je izračunata iz kalibracione krive rutin hidrata (*Sigma, Aldrich, Nemačka*). Rezultati su izraženi u mmol ekvivalenata rutina (*RE*) po gramu suve mase uzorka za vrste roda *Nepeta* ili sveže mase uzorka za *L. sativum* (mmol RE g<sup>-1</sup>).

**3.3.3.3. Kvalitativna i kvantitativna UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS i UHPLC/DAD/-HESI-MS/MS analiza sadržaja fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima tri vrste roda *Nepeta* i *L. sativum***

UHPLC i MS uslovi analiza su bili isti kao što je ranije opisano za analize nepetalaktona u metanolnim ekstraktima. Za kvalitativnu analizu fenolnih jedinjenja korišćeni su različiti tipovi (modaliteti) skeniranja, uključujući *FS, PIS, SRM* i *NLS*. Skeniranje jona urađeno je u pozitivnom i u negativnom modu, u opsegu *m/z* od 100 do 1000.

Ruzmarinska kiselina (RK), hlorogena kiselina (HK) i kafeinska kiselina (KK) su identifikovane na osnovu njihovih *UV, MS* i *MS/MS* spektara, kao i korišćenjem odgovarajućih rastvora standarda (*Sigma Aldrich, Nemačka*), pripremljenih u metanolu, u odnosu 1:1 (*w/v*). Stokovi standarda su razblaženi do koncentracije 20 µg ml<sup>-1</sup>. Kalibracioni nivoi su dobijeni injektiranjem različitih zapremina rastvora standarda.

Linerana regresiona analiza kalibracionih kriva je pokazala odličnu linearnost, uz korelacione koeficijente od  $r=0.9936$ ,  $p<0.001$  za RK,  $r=0.9753$ ,  $p<0.001$  za HK i  $r=0.9977$ ,  $p<0.001$  za KK. Kvantifikacija RK, HK i KK u svakom uzorku je urađena na osnovu površine pikova u SRM eksperimentu. Rezultati su predstavljeni kao  $\mu\text{g}$  u 100 mg sveže mase uzorka ( $\mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1}\text{SM}$ ).

Usled nedostupnosti standarda nekih jedinjenja od interesa u našim istraživanjima, njihova identifikacija je urađena poređenjem dobijenih UV, MS i MS/MS spektara sa literaturnim podacima, ali i na osnovu fragmentacionih profila sličnih jedinjenja. Takav je slučaj sa derivatima sinapične kiseline kod klijanaca *Lepidium sativum*: sinapoil-glukoza, sinapoil-holin, sinapoil-malat i sinapaldehid. Praćena je dinamika u promeni sadržaja ovih jedinjenja tokom 5 dana rastenja i razvića klijanaca. Rezultati su predstavljeni kao relativna količina jedinjenja (RA, eng. *relative abundance*) u 100 mg sveže mase uzorka ( $RA \ 100 \text{ mg}^{-1}\text{SM}$ ).

### **3.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakta tri vrste roda *Nepeta*, etarskog ulja (*N. rtanjensis* i *N. cataria*), ruzmarinske i hlorogene kiseline**

Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata nadzemnog dela *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* ispitivana je DPPH testom, ABTS<sup>+</sup> radikal katjon metodom i Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> redoks kapacitet (FRAP) testom. Takođe je ispitan antioksidativni potencijal etarskog ulja *N. rtanjensis* koje sadrži 73% *trans,cis*-nepetalaktona, etarskog ulja *N. cataria* koje sadrži 90% *cis,trans*-nepetalaktona,  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena, kao i dominantnih fenolnih jedinjenja, ruzmarinske i hlorogene kiseline koja su prisutna kod vrsta koje su korišćene u eksperimentu.

#### **3.4.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom**

DPPH radikal (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) je stabilan radikal sa maksimumom apsorpcije na 517 nm. Reakcijom antioksidanasa, stabilni DPPH radikali se transformišu u 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazin. Antioksidanti, donori vodonika u reakciji sa DPPH radikalima vrše njihovu redukciju do žuto obojenog difenil-pikrilhidrazina, što dovodi do smanjenja apsorbanca na 517 nm. Nivo obezbojenosti rastvora DPPH radikala ukazuje na kapacitet vezivanja radikala, odnosno potencijal antioksidativnih jedinjenja da redukuju DPPH.



*DPPH* test je urađen po metodi koju su prvobitno opisali *Brand-Williams* i sar., (1995). Reakciona smeša se sastojala od 500  $\mu$ l 200  $\mu$ M 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (*Sigma Aldrich*, Nemačka) rastvorenog u metanolu, 30  $\mu$ l uzorka i 470  $\mu$ l metanola. Reakciona smeša je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku, da bi se odigrala reakcija redukcije *DPPH* radikala. Stepem redukcije *DPPH* radikala je određen merenjem apsorbance na 517 nm, uz tri ponavljanja za svaki uzorak.

Kao standard je korišćen derivat vitamina E rastvorljiv u vodi - *troloks*, tj. 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina (*Sigma Aldrich*, Nemačka). Rezultati su predstavljeni na sledeći način:

a.) *DPPH* „*skevendžing*“ aktivnost

Računa se prema sledećoj formuli i predstavljena u procentima:

$$DPPH \text{ „skevendžing“ aktivnost} = \left( 1 - \left( \frac{A_{517uzorak}}{A_{517blank}} \right) \right) * 100$$

gde je  $A_{517blank}$  – apsorbance kontrole, koja je pripremljena tako što je umesto biljnog ekstrakta u reakcionu smešu dodata ista zapremina metanola.

b.) *TEAC* (antioksidativni kapacitet ekvivalenta troloksa)

izračunat iz standardne krive za troloks i izražen kao *mmol* ekvivalenta troloksa po gramu suve mase uzorka (*mmol TE g<sup>-1</sup>*).

c.) *IC<sub>50</sub>*

*IC<sub>50</sub>* predstavlja koncentraciju uzorka koja je potrebna za neutralizaciju 50 % *DPPH* radikala. Vrednosti su izražene kao redukjuća aktivnost ekvivalenta troloksa u *mmol* po gramu suve mase uzorka (*mmol TE g<sup>-1</sup>*).

### 3.4.2. *ABTS<sup>+</sup>* radikal katjon metoda *ABTS<sup>+</sup>*.

(2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikalski katjon test je spektrofotometrijska metoda koja je široko u upotrebi prilikom određivanja antoksidativne aktivnosti velikog broja jedinjenja. Primenljiv je kako za lipofilna, tako i za hidrofilna jedinjenja.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti  $ABTS^{+}$  radikal katjonskom metodom se zasniva na kolorimetrijskom merenju stepena obezbojavanja  $ABTS^{+}$  radikala u prisustvu antioksidanasa.  $ABTS^{+}$  radikalski katjon se dobija oksidacijom  $ABTS$  sa  $K_2S_2O_8$  (kalijum persulfat) pre dodavanja antioksidanasa. Relativno stabilan  $ABTS^{+}$  radikal je zelene boje i kvantifikuje se spektrofotometrijski na  $734\text{ nm}$ .  $ABTS$  test je urađen po metodi koju su prvobitno opisali Re i sar., (1999).  $ABTS^{+}$  je dobijen inkubacijom  $7\text{ mM}$  vodenog rastvora  $ABTS$  (*Sigma Aldrich*, Nemačka) sa  $2,45\text{ mM}$   $K_2S_2O_8$ , tokom 16 sati u mraku, na sobnoj temperaturi.

Za merenje antioksidativne aktivnosti rastvor dobijenog  $ABTS^{+}$  je razblažen 80% etanolom u odnosu 1:40 i ekvilibrisan na  $30^{\circ}\text{C}$  da bi se dobio rastvor čija je absorbanca  $0,70\pm 0,02$ . Reakciona smeša se sastojala od  $970\text{ }\mu\text{l}$   $ABTS$  rastvora i  $30\text{ }\mu\text{l}$  uzorka. Smeša je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, da bi se odigrala reakcija, a zatim je izmerena absorbanca na  $734\text{ nm}$ . Kao standard korišćen je *troloks*. Sva merenja su ponovljena tri puta.

Rezultati su predstavljeni na sledeći način:

a.)  $ABTS$  „*skevendžing*“ aktivnost prema sledećoj formuli

$$ABTS \text{ „skevendžing“ aktivnost} = \left( 1 - \left( \frac{A_{517uzorak}}{A_{517blank}} \right) \right) * 100$$

gde je  $A_{517blank}$  – apsorbancija kontrole, koja je pripremljena tako što je umesto biljnog ekstrakta u reakcionu smešu dodata ista zapremina metanola. Vrednosti su predstavljene u procentima.

b.)  $TEAC$  (antioksidativni kapacitet ekvivalenta troloksa), izračunat iz standardne krive za *troloks* i izražen kao  $\text{mmol}$  ekvivalenta troloksa po gramu suve mase uzorka ( $\text{mmol TE g}^{-1}$ ).

c.)  $IC_{50}$  predstavlja koncentraciju uzorka koja dovodi do 50 % inhibicije. Vrednosti su izražene kao redukujuća aktivnost ekvivalenta troloksa u  $\text{mmol}$  po gramu suve mase uzorka ( $\text{mmol TE g}^{-1}$ ).

### 3.4.3. Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> redoks kapacitet (*FRAP*) test

*FRAP* metod se zasniva na sposobnosti antioksidanasa koji su rastvorljivi u vodi da predaju elektron tj. redukuju Fe<sup>3+</sup> u Fe<sup>2+</sup>. Nastali Fe<sup>2+</sup> sa *TPTZ* reagensom (gvožđe-2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin) stvara plavo obojeni kompleks čija se absorbanca očitava na 593 nm. Reakcija se odigrava u kiseloj sredini (*pH* 3,6).

*FRAP* test u ovom radu urađen je po metodi koju su prvobitno opisali *Benzie* i *Strain* (1996). Reakciona smeša se sastojala od 300 mM Na-acetatnog pufera (*pH* 3,6), 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (gvožđe hlorid heksa hidrat) i 10 mM Fe<sup>3+</sup>-*TPTZ* (*Sigma Aldrich*, Nemačka) u odnosu 10:1:1. Fe<sup>3+</sup>-*TPTZ* je rastvoren u 40 mM HCl. Svaki uzorak je pripremljen mešanjem 950 µl sveže pripremljenog *FRAP* reagensa i 50 µl uzorka. Apsorbanca je merena posle 4 minuta, na 593 nm. Sva merenja su ponovljena tri puta. Vodeni rastvor troloksa je upotrebljen za konstrukciju kalibracione krive i rezultati su predstavljeni kao redukujuća aktivnost ekvivalenta troloksa u mmol po gramu suve mase uzorka (mmol TE g<sup>-1</sup>).

## 3.5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti metanolnog ekstrakta tri vrste roda

### *Nepeta*

**3.5.1. Priprema ekstrakta *Nepeta*** Metanolni ekstrakti tri vrste roda *Nepeta* su pripremljeni na isti način kao i za potrebe hemijskih analiza, bez dodavanja internog standarda geraniola. Metanolni uzorci su zatim koncentrovani na 30<sup>0</sup>C u vakuum uparivaču (*Eppendorf Concentrator 5301*, *Hamburg*, Nemačka) do suve mase i rastvoreni u 5% *DMSO*.

**3.5.2. Testirani mikroorganizmi** U radu su korišćeni mikroorganizmi deponovani u laboratoriji za Mikologiju, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd. Testirane su sledeće vrste bakterija: *Bacillus cereus* (klinički izolat), *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Enterobacter cloacae* (klinički izolat), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Korišćene su sledeće mikromicete: *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *A. versicolor* (ATCC 11730), *A. flavus* (ATCC 9170), *A. fumigatus* (klinički izolat), *Fusarium sporotrichoides* (ITM 496), *Fulvia fulvum* (TK 5318), *Penicillium funiculosum* (ATCC 11797), *P. ochrochloron* (ATCC 9112) i *Trichoderma viride* (IAM 5061).

**3.5.3. Testirani antibiotici i antimikotici** Korišćeni su antibiotici streptomycin, koji sadrži 1 mg aktivne supstance u 1 ml DMSO (*Sigma Aldrich*, Nemačka (P7794)), i amoksicilin koji sadrži 500 mg amoksicilin trihidrata u 500 ml DMSO (Panfarma, Beograd, Srbija). Referentne supstance koje su korišćene kao antimikotici su bifonazol (Bicutrin) i ketokonazol. Losion bifonazol sadrži 1 g aktivne supstance u 100 ml razblaženog etanola uz dodatak solubizatora i glicerola (Srbolek, Beograd, Srbija). Ketokonazol sadrži 200 mg ketokonazola u 200 ml DMSO (Hemofarm koncern A.D., Vršac, Srbija).

Testirani antibiotici i mikotici su korišćeni kao pozitivna kontrola (1-3500 µg/ml), a 5% DMSO kao negativna kontrola. Testovi su urađeni u duplikatu i ponovljeni tri puta.

**3.5.4. In vitro testovi za određivanje antimikrobne aktivnosti** Za *in vitro* ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata, korišćena je mikrodilucina metoda, 96-sistem (Hanel i Raether, 1988; Daouk i sar., 1995). Za test organizme odabrano je 8 vrsta bakterija i 8 vrsta gljiva.

**3.5.5. Pripremanje prekončne kulture bakterija** Bakterijski sojevi, čiji su stokovi čuvani u glicerolu, sterilnom špatulom su zasejani u 2 ml TSB hranljive podloge (eng. *Tryptic Soy Broth*, *Biolife*, Italija), koje su sadržale 30 g l<sup>-1</sup> triptik soje. Podloge su sterilisane 15 minuta na 121°C. Zasejane kulture u duplikatu, zajedno sa kontrolnim TSB epruvetama inkubirane su u termostatu tokom 24 sata, na 37°C. Iz prekončnih kultura koje sadrže približno 1.0 x 10<sup>9</sup> ćelija ml<sup>-1</sup>, uzeto je po 100 µl i preneto u mikrotube koje sadrže 900 µl hranjive podloge. Tako je dobijena koncentracija od 1.0 x 10<sup>8</sup> ćelija ml<sup>-1</sup>. Daljim serijskim razređenjima dobijaju se željene koncentracije. Za mikrodilucionu metodu je korišćena koncentracija 1.0 x 10<sup>6</sup> ćelija ml<sup>-1</sup>.

**3.5.6. Pripremanje kultura mikromiceta** Mikromicete su gajene na *MA* hranljivoj podlozi (eng. *Malt-Agar*) u periodu od 21-og dana na 26°C. Njihovo čuvanje je vršeno na +4°C do trenutka upotrebe (Booth, 1971). *MA* hranljiva podloga je sadržala 15 g l<sup>-1</sup> agara i 50 g l<sup>-1</sup> ekstrakta slada. *pH* vrednost podloge je podešena na 7 pre sterilizacije autoklaviranjem, tokom 25 minuta na 121°C. Inokulum je pripreman spiranjem spora sa površine medijuma, u kulturama starim 21 dan, korišćenjem sterilnog 0.85% rastvora NaCl-a koji sadrži 0.1% *Tween* 80 (v/v). Suspenzija spora je sterilnim rastvorom NaCl-a dovedena do konačne koncentracije od 1.0 x 10<sup>5</sup> ćelija ml<sup>-1</sup> medijuma. Tako pripremljen inokulum držan je na +4°C do upotrebe. Radi provere validnosti inokuluma, kao i odsustva kontaminacije, vršena je inokulacija na čvrstu podlogu (*MA*).

**3.5.7. Metoda mikrodilucije** Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (*MIC*) vršeno je serijskim razređenjem ekstrakata rastvorenih u *DMSO*. Tako pripremljeni ekstrakti dodavani su u tečni medijum sa inokulumom.

Mikroploče sa inokuliranim gljivama i testiranim ekstraktima su inkubirane 72 sata na 28°C, dok su ploče sa bakterijama držane na 37°C tokom 48 sata. Najmanja koncentracija na kojoj nije bilo vidljivog rasta mikroorganizama podrazumevana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (*MIC*). Minimalne baktericidne koncentracije (*MBC*) i minimalne fungicidne koncentracije (*MFC*) određivane su reinokulisanjem po 2 µl u 100 µl svežeg tečnog medijuma i inkubirane sledećih 24 sata na 37°C u slučaju bakterija i 72 sata na 28°C za gljive. Ukoliko nije bilo rasta tj. koncentracija ekstrakata koja ubija 99.5% bakterija/gljiva u odnosu na početni inokulum, uzimane su za *MBC* ili *MFC* (CSLI, 2006, Tsukatani i sar., 2012).

Na kraju je u mikrotitracione ploče dodato 40 µl boje p-jodonitrotetrazolijum violet (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolijum hlorid) u koncentraciji 2 mg ml<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O (*Sigma Aldrich*, Nemačka), nakon čega je usledila inkubacija tokom 2 sata na 37°C. Mesta koja se nisu obojila su rezultat mikrobicidnog dejstva, a mesta sa bleđom bojom u odnosu na kontrolu (koja je ljubičaste boje) su rezult mikrobistatičkog dejstva.

### 3.6. Analiza antioksidativnih enzima *Lepidium sativum*

Oksidativni stres je praćen kod klijanaca kresa koji su klijali i rasli u ko-kulturi sa *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*. Oksidativni stres je praćen od prvog do petog dana rasta u ko-kulturi. Determinacija izoformi enzima (katalaza, peroksidaza, superoksid dismutaza i polifenol oksidaza) vršena je nakon razdvajanja proteina pomoću nativne elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (eng. *Native PAGE*). Razdvajanje proteina je takođe izvršeno i denaturišućom eng. *SDS-PAGE* elektroforezom i ispitano je prisustvo specifičnih proteina eng. *Immuno blotting* analizom. Gelovi su slikani koristeći *Gel-Doc™ EQ System (Life Science Research, Bio-Rad Co.)*. Analiza gelova je rađena primenom grafičkog paketa *ImageJ 1.32j software (W. Rasband, National Institute of Health, SAD)*. Uzorci su analizirani u 3 ponavljanja.

Osim navedenog, rađena je i spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza, peroksidaza, superoksid dismutaza i polifenol oksidaza.

#### 3.6.1. Ekstrakcija ukupnih proteina

Uzorci kresa su mehanički usitnjeni do sitnog praha u tečnom azotu, a zatim homogenizovani u izolacionom puferu (1:3 w/v). Za izolaciju proteina korišćen je 100 mM kalijum fosfatni pufer (pH 6,5) koji je sadržao 20  $\mu\text{l ml}^{-1}$  koktela inhibitora proteaza (*Protease Inhibitor Cocktail for Plant Tissue, Sigma-Aldrich, SAD*) i 10% (w/v) nerastvornog polivinilpolipirolidona (*PVPP, Sigma-Aldrich, SAD*). Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani 20 minuta na 15000 g, na temperaturi od +4°C. Koncentracija ukupnih proteina u supernatantu određena je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 595 nm (*Bradford, 1976*), uz korišćenje *BSA* (eng. *Bovine Serum Albumin*) kao proteinskog standarda.

### 3.6.2. Nativna elektroforeza (eng. *Native PAGE*)

Determinacija izoformi enzima vršena je nakon razdvajanja proteina pomoću nativne elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (eng. *Native PAGE*). Uzorcima je dodavan glicerol do finalne koncentracije od 10%. Na gel je nanášeno 20  $\mu\text{g}$  proteina po uzorku.

Za nativnu elektroforezu je korišćen 5% gel za koncentrovanje (eng. *stacking gel*) i 10% gel za razdvajanje (eng. *separating gel*), izuzev u slučaju determinacije izoformi katalaza kada je korišćen 7% gel za razdvajanje. Razdvajanje proteina je vršeno tokom 120 minuta na 4°C, u puferu koji je sadržao 25 mM Tris i 192 mM glicin (pH 8.3), korišćenjem *Mini-Protein II* sistema (*Bio-Rad, Richmond, CA*), pri čemu je napon podešen na 120 V.

#### 3.6.2.1. Elektroforetska detekcija aktivnosti katalaza (CAT)

Za potvrđivanje katalazne aktivnosti korišćena je metoda koju su prvobitno opisali *Woodbury i sar.*, (1971). Gelovi su nakon nativne elektroforeze preinkubirani 30 minuta u 0,01% rastvoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v), a zatim tretirani smešom 2% rastvora kalijum fericijanida (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) i 2% rastvora ferihlorida (FeCl<sub>3</sub>). U reakciji kalijum fericijanida i ferihlorida nastaje jedinjenje plavo-zelene boje KFe<sup>III</sup>(Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>). Na mestima na kojima je prisutna katalaza, koja vrši degradaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, došlo je do obezbojavanja gela.

#### 3.6.2.2. Elektroforetska detekcija aktivnosti peroksidaza (POD)

Za potvrđivanje peroksidazne aktivnosti korišćena je metoda koju su opisali *Jiménez-Atiénzar i sar.*, (2007) sa određenim izmenama. Gelovi su nakon nativne elektroforeze inkubirani u 50 mM kalijum fosfatnom puferu (pH 6,5) koji je sadržao 10% rastvor 4-hloro- $\alpha$ -naftola (w/v) i 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v). Na mestima na kojima je bila prisutna peroksidaza, koja je katalizovala reakciju prenosa elektrona sa 4-hloro- $\alpha$ -naftola na peroksid, pojavile su se tamne trake.

### **3.6.2.3. Elektroforetska detekcija aktivnosti superoksid dismutaza (SOD)**

Za ispitivanje aktivnosti superoksid dismutaza korišćena je metoda po *Beauchamp* i *Fridovich* (1971). Gelovi su inkubirani 30 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi, u smeši koja je sadržala 100 mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), 0,098 mM NBT (*Nitrotetrazolim blue chloride*, *SigmaAldrich*, SAD), 0,03 mM riboflavin i 2 mM TEMED (*N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*, *SigmaAldrich*, SAD) u kalijum fosfatnom puferu (pH 7,8). Nakon inkubacije, gelovi su dobili ljubičastu boju usled formiranja formazana, a na mestima aktivnosti superoksid dismutaza pojavile su se bezbojne trake. Različite SOD izoforme su identifikovane tako što su gelovi inkubirani u rastvoru inhibitora (3 mM KCN ili 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pre bojenja.

### **3.6.2.4. Elektroforetska detekcija aktivnosti polifenol oksidaza (PPO)**

Za potvrđivanje aktivnosti polifenol oksidaza korišćena je metoda koju su opisali *Jiménez-Atiénzar* i sar., (2007) sa određenim izmenama. Gelovi su nakon native elektroforeze inkubirani u 0,1% rastvoru pirokatehola (1,2-dihidroksi benzen (*Sigma Aldrich*, Nemačka)) u 100 mM kalijum fosfatnom puferu (pH 6,5), do pojave tamnih traka.

## **3.6.3. Spektrofotometrijska analiza enzimske aktivnosti**

### **3.6.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti ukupnih katalaza**

Aktivnost katalaza određena je praćenjem kinetike nestajanja vodonik peroksida ( $A_{240}$   $\epsilon=0,0436 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) u reakcionoj smeši, prema metodi *Aebi* (1984). Reakciona smeša se sastojala od 340  $\mu\text{l}$  reagensa 1 (50 mM K-Na-fosfatni pufer pH 7,0 i 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), apsorbanca reagensa 1 na 240 nm je iznosila  $0,85 \pm 0,02$ , reagensa 2 (650  $\mu\text{l}$  50 mM K-Na-fosfatni pufer pH 7,0) i 10  $\mu\text{l}$  uzorka. Praćena je promena apsorbanca reakcione smeše na 240 nm.



Aktivnost CAT je merena na svakih 20 sekundi tokom 3 minuta, na temperaturi od 20°C, i izračunata prema jednačini:

$$A_{CAT} = \frac{(\Delta A - \Delta A_0) * V_k * 1000}{0.0436 * V_e}$$

$\Delta A$  - promena apsorbance ( $min^{-1} cm^{-1}$ )

$\Delta A_0$  - promena apsorbance blank rastvora ( $min^{-1} cm^{-1}$ )

$V_K$  - zapremina reakcione smeše u kivetu ( $ml$ )

$V_E$  - zapremina uzorka u kivetu ( $ml$ )

**0,0436** - milimolarni ekstinkcioni koeficijent  $H_2O_2$  na 240 nm ( $mM^{-1} cm^{-1}$ ).

### 3.6.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti ukupnih peroksidaza

Aktivnost peroksidaza je izmerena po metodi *Jiménez-Atiéndzar i sar.*, (2007). POD aktivnost je merena uz korišćenje pirogalola ( $A_{430} \epsilon=2,47 mM^{-1} cm^{-1}$ ) kao elektron-donora. Reakciona smeša je sadržala 10  $\mu l$  uzorka, 12,5  $\mu l$  0,5 mM rastvora  $H_2O_2$  i 10  $\mu l$  10 mM pirogalol (*Sigma Aldrich*, Nemačka) u 968  $\mu l$  50 mM kalijum fosfatnog pufera (pH 6,5). Oksidacijom pirogalola nastaje smeđe obojen purpurogalin sa maksimumom apsorpcije na 430 nm. Aktivnost enzima je praćena tokom 3 minuta, pri temperaturi od +20°C i izračunata je prema jednačini:

$$A_{POD} = \frac{(\Delta A - \Delta A_0) * V_k * 1000}{2.47 * V_e}$$

$\Delta A$  - promena apsorbance ( $min^{-1} cm^{-1}$ )

$\Delta A_0$  - promena apsorbance blank rastvora ( $min^{-1} cm^{-1}$ )

$V_K$  - zapremina reakcione smeše u kivetu ( $ml$ )

$V_E$  - zapremina uzorka u kivetu ( $ml$ )

**2,47** - milimolarni ekstinkcioni koeficijent pirogalola na 430 nm ( $mM^{-1} cm^{-1}$ ).

### 3.6.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti ukupnih superoksid dismutaza

Ukupna aktivnost superoksid dismutaza je određena prema metodi *Beyer i Fridovich* (1987). Reakciona smeša se sastojala od: 100 mM kalijum fosfatnog pufera (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 3mM L-metionina, 5mM NBT i 2 mM riboflavina.

Reakcija je izazvana izlaganjem reakcione smeše osvetljenju od 30 W pod fluorescentnom lampom, u trajanju od 15 minuta na temperaturi od +20°C. SOD aktivnost je određivana na osnovu kapaciteta ekstrakta da inhibira fotohemijску redukciju NBT do formazana. Apsorbanca na 540 nm je izmerena pomoću ELISA Micro Plate Reader aparata (LKB 5060-006, Austrija). Aktivnost ukupnih SOD izražena je kao  $U\ mg^{-1}$ . Jedna SOD jedinica (U) je definisana kao količina enzima neophodna da inhibira 50% NBT u poređenju sa smešom bez uzorka proteina i izražava se u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina.

### 3.6.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti ukupnih polifenol oksidaza

Za određivanje PPO aktivnosti korišćena je metoda koju su opisali *Jiménez-Atiénzar i sar.*, (2007) sa određenim izmenama. Reakciona smeša se sastojala od 50 mM kalijum fosfatnog pufera (pH 6,5), a kao supstrat korišćen je 10 mM rastvor pirokatehola (*Sigma Aldrich*, Nemačka). Praćena je promena apsorbance na 410 nm, pri čemu se jedinica aktivnosti enzima (U) definiše kao promena apsorbance za 0.001 po minutu u 1 ml reakcione smeše:

$$A_{PPO} = \frac{\Delta A * V_k}{0.001 * V_e}$$

$\Delta A$  - promena apsorbance u ( $min^{-1} cm^{-1}$ )

$V_k$  – zapremina reakcione smeše u kivetu (ml)

$V_e$  – zapremina uzorka u kivetu (ml).

Sva merenja za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaza, peroksidaza, superoksid dismutaza i polifenol oksidaza su rađena u 3 ponavljanja. Aktivnost enzima je izražena u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina ( $U\ mg^{-1}$ ).

#### **3.6.4. SDS-PAGE elektroforeza i imunodetekcija proteina (eng. *Immuno blotting*)**

Uzorci su pripremljeni mešanjem ekstrakta ukupnih proteina kresa sa puferom za uzorke u odnosu 1:1 (v:v) (Laemmli, 1970). Pufer za uzorke sadrži 62 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2,5% BPB (eng. *bromophenol blue*), 2% Na-dodecil sulfat (SDS), 10% glicerol i 0,5%  $\beta$ -merkaptoetanol. Uzorci su kuvani 5 minuta na 95°C, nakon čega su ohlađeni do 4°C i centrifugirani 3 minuta na 12000 g.

Razdvajanje proteina je izvršeno denaturišućom SDS-PAGE elektroforezom, na *Mini-Protein II* sistemu (Bio-Rad, SAD). Proteini su razdvajani 120 minuta na 200 V. Finalna koncentracija akrilamida u razdvajajućem gelu bila je 10% (w:v), a u gelu za koncentrovanje 5% (w:v). Na gelove su nanošene jednake zapremine uzoraka sa 20  $\mu$ g ukupnih proteina. Za određivanje molekulske mase proteina korišćeni su obojeni markeri molekulskih masa 10-260 kDa-Spectra<sup>TM</sup> Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas GmbH, Nemačka). Razdvajanje proteina je paralelno vršeno na dva gela. Jedan je korišćen za bojenje ukupnih proteina na gelu. Bojenje proteina je izvršeno inkubiranjem gela u rastvoru boje eng. *Coomassie Blue* tokom 45 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je gel obezbojavan u PDS rastvoru (eng. *Protein Destaining Solution*), koji sadrži 15% metanola (v/v) i 7% glacijalne sirćetne kiseline (v/v). Drugi gel je iskorišćen za *Immuno blotting* analizu.

U imuno blot proceduri, proteini su sa 10% poliakrilamidnog gela prenošeni na nitroceluloznu membranu (Bio-Rad, SAD) u transfer puferu (TB) koji sadrži 25 mM Tris-HCl (pH 8,3) i 192 mM glicin, putem elektrotransfera (*Mini Trans-Blot Module*, Biorad, SAD). Transfer proteina je vršen na 60 V tokom 1,5 sata. Blotovane membrane su nakon toga preinkubirane preko noći na 4°C, u rastvoru 10% nemasnog mleka u prahu (NFDM: *Non fat dry milk*, Nestle, SAD) u T-PBS puferu (PBS buffer + 0,05% Tween-20). PBS pufer (eng. *Phosphate-Buffered Saline*) sadrži 80 g l<sup>-1</sup> NaCl, 2 g l<sup>-1</sup> KCl, 37,2 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×12H<sub>2</sub>O i 2,4 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Sledećeg dana su membrane inkubirane sa primarnim antitelom, tokom 2 sata na sobnoj temperaturi, uz blago mešanje. Primarna antitela su rastvorena u T-PBS puferu

koji je sadržao 5% *NFDM*. Membrane su zatim ispirane u *T-PBS* puferu, prema šemi: 2x1 minuta; 1x15 minuta; 3x5 minuta. Sledila je jednočasovna inkubacija membrana sa sekundarnim antitelom, na sobnoj temperaturi. Sekundarno antitelo je rastvoreno u *T-PBS* puferu koji sadrži 5% *NFDM*. Detekcija antigenih proteina izvršena je metodom pojačane hemiluminiscencije (eng. *Enhanced ChemiLuminescence-ECL*).

Membrane su inkubirane 5 minuta u 12 ml smeše koja je sadržala 0,2 mM p-kumarnu kiselinu (*Sigma Aldrich, St. Louis, SAD*), 1,25 mM 3-amino ftalidrazid ("Luminol", *Sigma Aldrich, St. Louis, SAD*) i 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v:v) u 100 mM Tris-HCl puferu. Nakon toga, membrane su izložene filmu (*Kodak X-Omat LS film, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD*), u trajanju od 5 minuta.

**3.6.4.1. Primarna antitela:** Za imunodetekciju PPO korišćena su mišja poliklonalna antitela dobijena imunizacijom eksperimentalnih životinja sa PPO gljiva (*Mouse Anti-fungi PPO*). Antitela su rastvorena u *T-PBS* puferu koji je sadržao 5% *NFDM*, u odnosu 1:500 (v:v). Za imunodetekciju CuZn-SOD korišćena su komercijalna primarna antitela: *CSD2* (eng. *Anti Rabbit Chloroplastic CuZn Superoxide Dismutase, AS06 170 (Agrisera Antibodies, Švedska)*). *CSD2* antitela su rastvorena u *T-PBS* puferu koji je sadržao 5% *NFDM*, u odnosu 1:10000 (v:v). Za imunodetekciju Mn-SOD, takođe su korišćena komercijalna antitela (eng. *Anti Rabbit Mn-Superoxide Dismutase AS09 524, Agrisera Antibodies, Švedska*), a rastvorena su u puferu istog sastava, u odnosu 1:10000 (v:v).

**3.6.4.2. Sekundarna antitela:** U radu su korišćena komercijalna sekundarna antitela, koja su konjugovana sa peroksidazom iz rena i rastvorena u *T-PBS* puferu koji sadrži 5% *NFDM*, u odnosu 1:20000 (v:v): 1) eng. *Goat Anti- Rabbit IgG-HRP (product No. A0545, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)*; 2) eng. *Goat Anti-Mouse IgG-HRP (No. SC 2031, Agrisera Antibodies, Švedska)*.

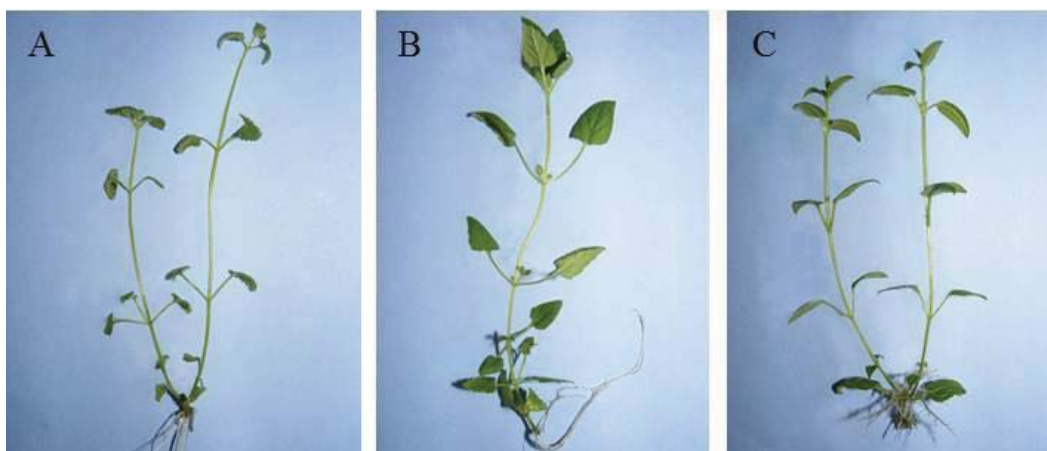
### 3.7. Statistička analiza podataka

Numerički rezultati su obrađivani *One-Way* analizom varijanse (*ANOVA* test) primenom računarskog programa *Statgraphics Centurion XVI*. Određivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti vršeno je: *Fisher's LSD (least significant difference)* testom na nivou značajnosti od  $p \leq 0,05$ . Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti od tri ponavljanja. Različita slova koja prate numeričke vrednosti ukazuju na statistički značajne razlike. Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa *Microsoft Office Excel*.

## 4. REZULTATI

### 4.1. *In vitro* kultura tri vrste roda *Nepeta*

Sterilisana semena tri vrste roda *Nepeta* uspešno su isklijana na  $\frac{1}{2}$  MS hranljivoj podlozi u uslovima *in vitro* (>70%) (Slika 13A 13B 13C). Dalje umnožavanje je urađeno korišćenjem segmenta stabla sa po jednim nodusom i vršnih delova izdanaka, do obezbeđivanja dovoljne količine biljnog materijala za dalja istraživanja.



**Slika 13.** Vrste roda *Nepeta* iz kulture *in vitro*. A) *Nepeta rtanjensis* B) *Nepeta sibirica* C) *Nepeta nervosa*.

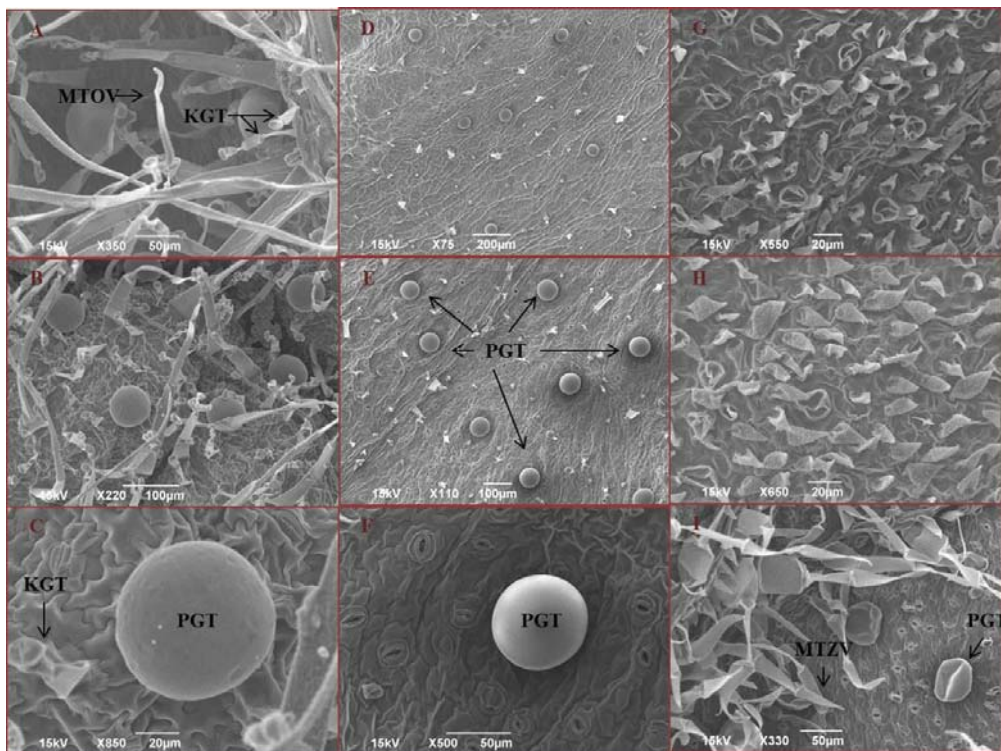
Posle četiri nedelje rasta u kulturi *in vitro*, primećeneno je formiranje aksilarnih pupoljaka u pazuhu listova na eksplantatima, njihovo izduživanje, kao i spontano ožiljavanje na podlozi bez regulatora rasta. Spontano ožiljavanje *N. rtanjensis* i *N. nervosa* je iznosilo oko 40%, dok je ožiljavanje kod *N. sibirica* bilo približno 35%. Na izduženim izdancima formiralo se u proseku od 3 do 5 nodusa. Morfološki parametri koji su beleženi mesec dana od postavke eksperimenta predstavljeni su u Tabeli 4.

**Tabela 4.** Parametri rastenje i morfogeneza *Nepeta rtanjensis*, *N. sibirica*, *N. nervosa* na ½ MS hranljivoj podlozi sa 20 g l<sup>-1</sup> saharoze. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± standardna greška.

	<i>N. rtanjensis</i>	<i>N. sibirica</i>	<i>N. nervosa</i>
Dužina izdanka [mm]	53,67 ± 1,95	51,04 ± 2,30	58,43 ± 2,50
Broj nodusa po izdanku	4,35 ± 0,11	3,26 ± 0,14	4,91 ± 0,14
Broj aksilarnih pupoljaka po izdanku	8,12 ± 0,22	6,35 ± 0,24	9,47 ± 0,28
% ožiljavanja	39,34	34,52	40,99
Sveža masa [g]	0,27 ± 0,07	0,171 ± 0,041	0,134 ± 0,011
Suva masa [g]	0,021 ± 0,001	0,023 ± 0,004	0,012 ± 0,001
Sveža masa/Suva masa	0,124 ± 0,003	0,151 ± 0,001	0,114 ± 0,006

#### 4.2. Analiza žlezdanih struktura površine lista tri vrste roda *Nepeta*

Na elektronskim mikrografijama lica lista tri vrste roda *Nepeta sp.* koje su rasle u uslovima *in vitro*, najveće razlike se uočavaju u pogledu mehaničkih i žlezdanih struktura. Kod vrste *N. rtanjensis* uočava se da indumentum sačinjava veliki broj glandularnih i mehaničkih trihoma (Slika 14A 14B), kod *N. sibirica* uočene su samo glandularne trihome (Slika 14D 14E 14F), dok se kod vrste *N. nervosa* uočava prisustvo velikog broja mehaničkih i samo po koja žlezdana struktura (Slika 14G 14H 14I). Na semi-elektronskoj mikrografiji *N. rtanjensis* uočene su peltatne i kapitatne glandularne trihome (Slika 14C), dok su od mehaničkih trihoma uočene trihome sa zaobljenim vrhom (Slika 14A). Kod *N. sibirica* uočene su peltatne glandularne trihome (Slika 14F), a kod *N. nervosa* je pored peltatnih žlezdanih trihoma detektovan i veliki broj mehaničkih trihoma, uglavnom sa zašiljenim vrhom (Slika 14I).



**Slika 14.** Elektronska mikrografija lista tri vrste roda *Nepeta*. A-C) indumentum lica lista *N. rtanjensis* D-F) indumentum lica lista *N. sibirica* G-I) indumentum lica lista *N. nervosa*. Skraćenice: KGT- kapitatne glandularne trihomi PGT- peltatne glandularne trihomi MTOV- mehaničke trihomi sa zaobljenim vrhom MTZV- mehaničke trihomi sa zašiljenim vrhom.

### 4.3. Fitohemijske analize *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* gajenih *in vitro*

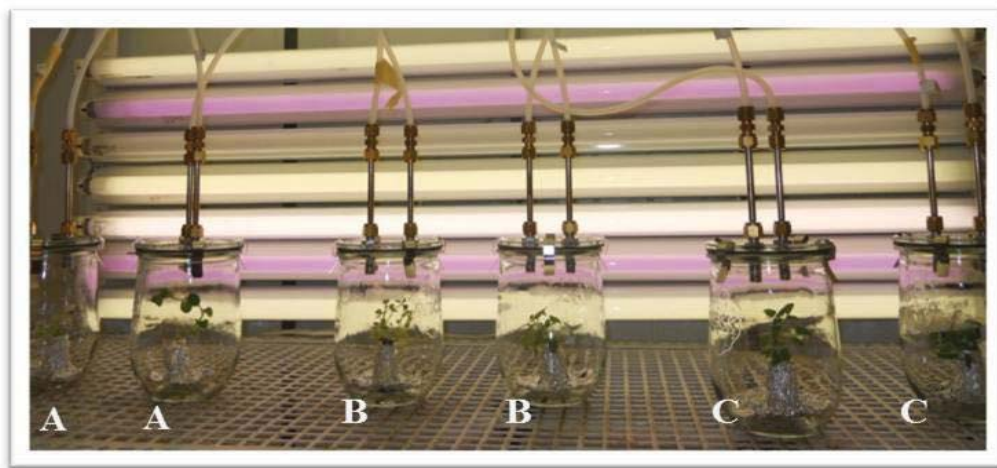
#### 4.3.1. Analiza isparljivih jedinjenja u kulturi *in vitro* *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*

##### 4.3.1.1. *Headspace GC-MS* analiza

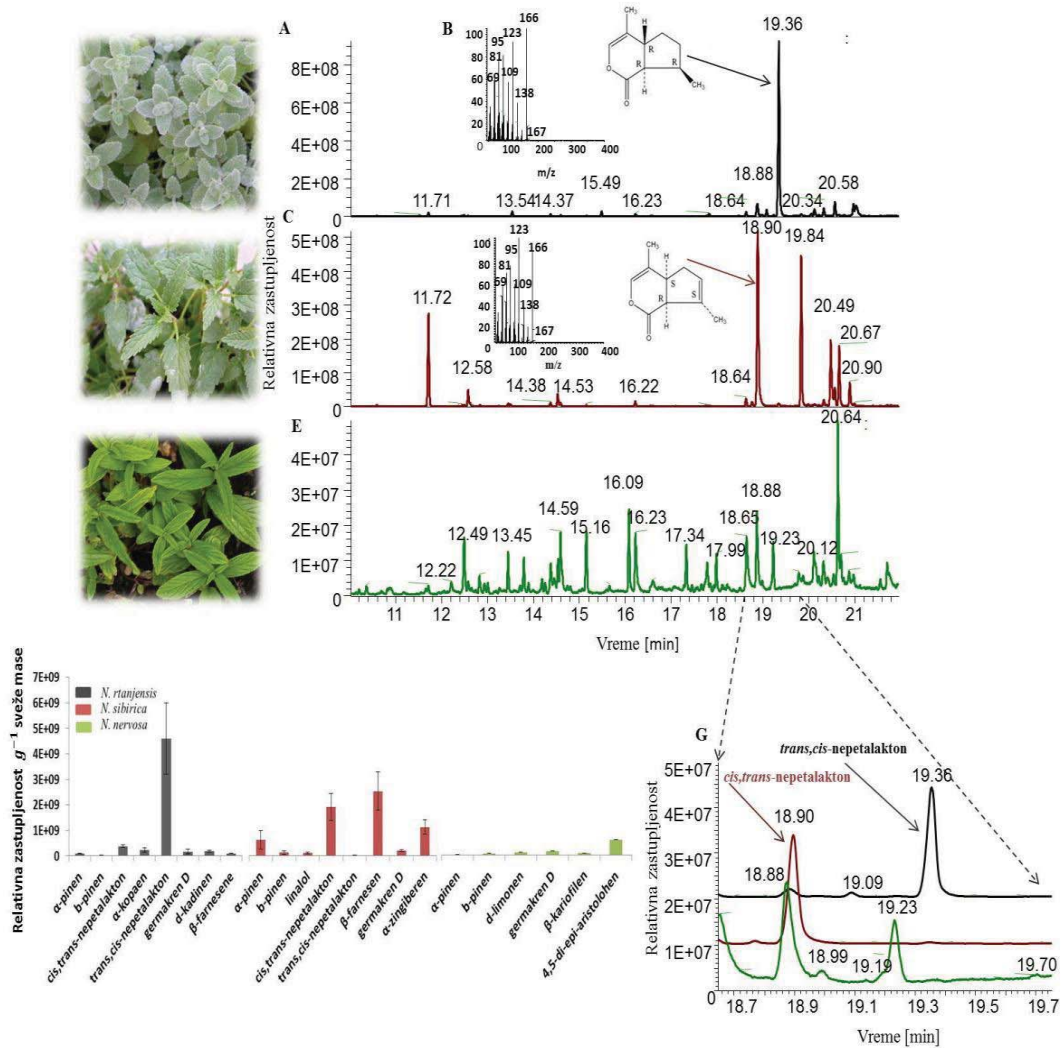
*Headspace GC-MS* analizom urađena je identifikacija i kvantifikacija isparljivih jedinjenja oslobođenih sa površine listova tri vrste roda *Nepeta*. Na Slici 15 prikazano je prikupljanje isparljivih jedinjenja vrsta iz roda *Nepeta* za potrebe *Headspace GC-MS* analize. U atmosferi *N. rtanjensis*, kao dominantno jedinjenje detektovan je *trans,cis*-nepetalakton (Slika 16A 16G), koji se na *GC-MS* hromatogramu uočava na  $R_t=19,36$  minuta.



Na masenom spektru *trans,cis*-nepetalaktona, koji pokazuje molekularni jon  $m/z$   $[M+H]^+$  od 167 (Slika 16B), uočeni su dominantni fragmenti od  $m/z$  166 (intenzitet 100%) i  $m/z$  123 (90%). Pored *trans,cis*-nepetalaktona, u kulturi *in vitro* rtanjske metvice identifikovani su i drugi monoterpeni ( $\alpha$ -pinen, *cis,trans*-nepetalakton,  $\alpha$ -kopaen) i seskviterpeni (germakren D,  $\beta$ -farnezen,  $\delta$ -kadinen), koji su prisutni u značajno nižim koncentracijama od *trans,cis*-nepetalaktona (Slika 16F). Rezultati su pokazali da je dominantni monoterpen u atmosferi *N. sibirica* (Slika 16C 16G) *cis,trans*- isomer nepetalaktona ( $R_t=19,84$  minuta), koji pokazuje molekularni jon  $m/z$   $[M+H]^+$  od 167 (Slika 16D) i fragment od  $m/z$  166 sa intenzitetom 90%. Od ostalih monoterpena identifikovani su još  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, linalol i *trans,cis*-nepetalakton, ali u znatno nižoj koncentraciji (Slika 16F). Za razliku od *N. rtanjensis*, kod *N. sibirica* je detektovana značajna količina seskviterpena  $\beta$ -farnezena,  $\alpha$ -zingiberena i germakrena D. U atmosferi tegle u kojima je gajena *N. nervosa* nije detektovan nepetalakton (Slika 16E 16G), dok su ostala isparljiva jedinjenja prisutna u niskim koncentracijama (Slika 16F):  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen,  $\delta$ -limonen (monoterpeni), germakren D,  $\beta$ -kariofilen i 4,5-di-epi-aristolohen (seskviterpeni).



**Slika 15.** Prikupljanje isparljivih jedinjenja u Tanex kolone za potrebe *headspace GC-MS*: analize: A) *N. rtanjensis* B) *N. sibirica* C) *N. nervosa*.

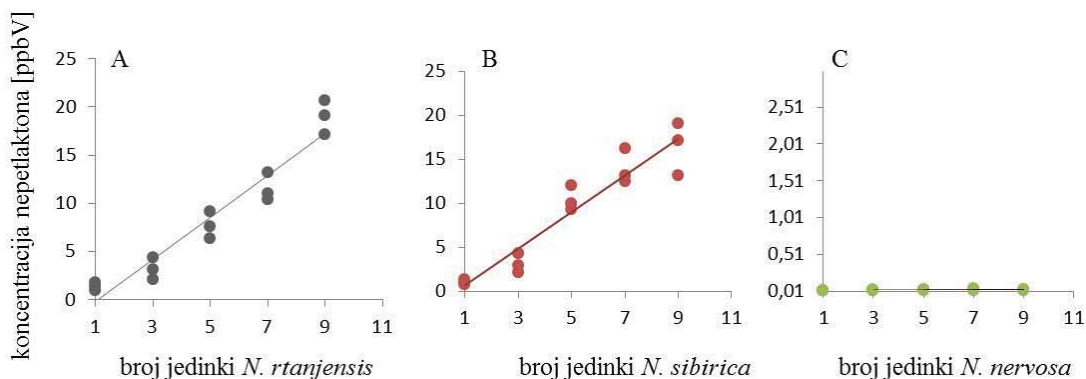


**Slika 16.** *Headspace* GC-MS analiza isparljivih jedinjenja u kulturi *in vitro* izdanaka *N. ratanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*: A) *Headspace* GC-MS hromatogram isparljivih jedinjenja *N. ratanjensis* i (B) maseni spektar *trans,cis*-nepetalaktona ( $R_t=19,36$  minuta); C) *Headspace* GC-MS hromatogram isparljivih jedinjenja *N. sibirica* i (D) maseni spektar *cis,trans*-nepetalaktona ( $R_t=18,90$  minuta); E) *Headspace* GC-MS hromatogram isparljivih jedinjenja *N. nervosa*; F) Relativna zastupljenost identifikovanih monoterpena i seskviterpena u atmosferi posuda za *in vitro* gajenje *N. ratanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*. Vrednosti su normalizovane u odnosu na 1 g sveže mase; G) Izdvojen i uvećan region *headsapce* GC-MS hromatograma, u vremenskom intervalu  $R_t$  od 19,7 do 19,7 minuta, u kome se uočavaju izomeri nepetalaktona.

#### 4.3.1.2. PTR-MS analiza

Nakon kvalitativne *Headspace GC-MS* analize i identifikacije isparljivih jedinjenja u kulturi *in vitro* izdanaka *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, relativna kvantifikacija nepetalaktona u atmosferi posuda u kojoj su gajene biljke urađena je PTR-MS analizom. Praćena je koncentracija nepetalaktona na protonovanoj masi  $m/e$   $[M+1]^+$  od 167, pri čemu nije bilo moguće razdvajanje izomera nepetalaktona. Izmerene vrednosti izražene su u *ppbV*, i ukazuju na količinu date hemijske supstance u bilionitom delu atmosfere.

U eksperimentu u kome je praćen efekat količine biljnog materijala na sadržaj nepetalaktona u atmosferi *in vitro* kultura, koncentracija nepetalaktona merena je u posudama u kojima su gajene od 1 do 9 jedinki *N. rtanjensis*, *N. sibirica* ili *N. nervosa*. Srazmerno broju jedinki gajenih u posudama za *in vitro* kulture, raste aktivna površina listova sa koje se oslobađaju isparljiva jedinjenja, a samim tim i koncentracija analiziranog monoterpena (Slika 17A 17B). Najveća koncentracija nepetalaktona zabeležena je u slučaju kad je gajeno po 9 jedinki *N. rtanjensis* ili *N. sibirica*. U atmosferi posude gde je gajena vrsta *N. nervosa* nepetalakton je detektovan u tragovima (Slika 17C).

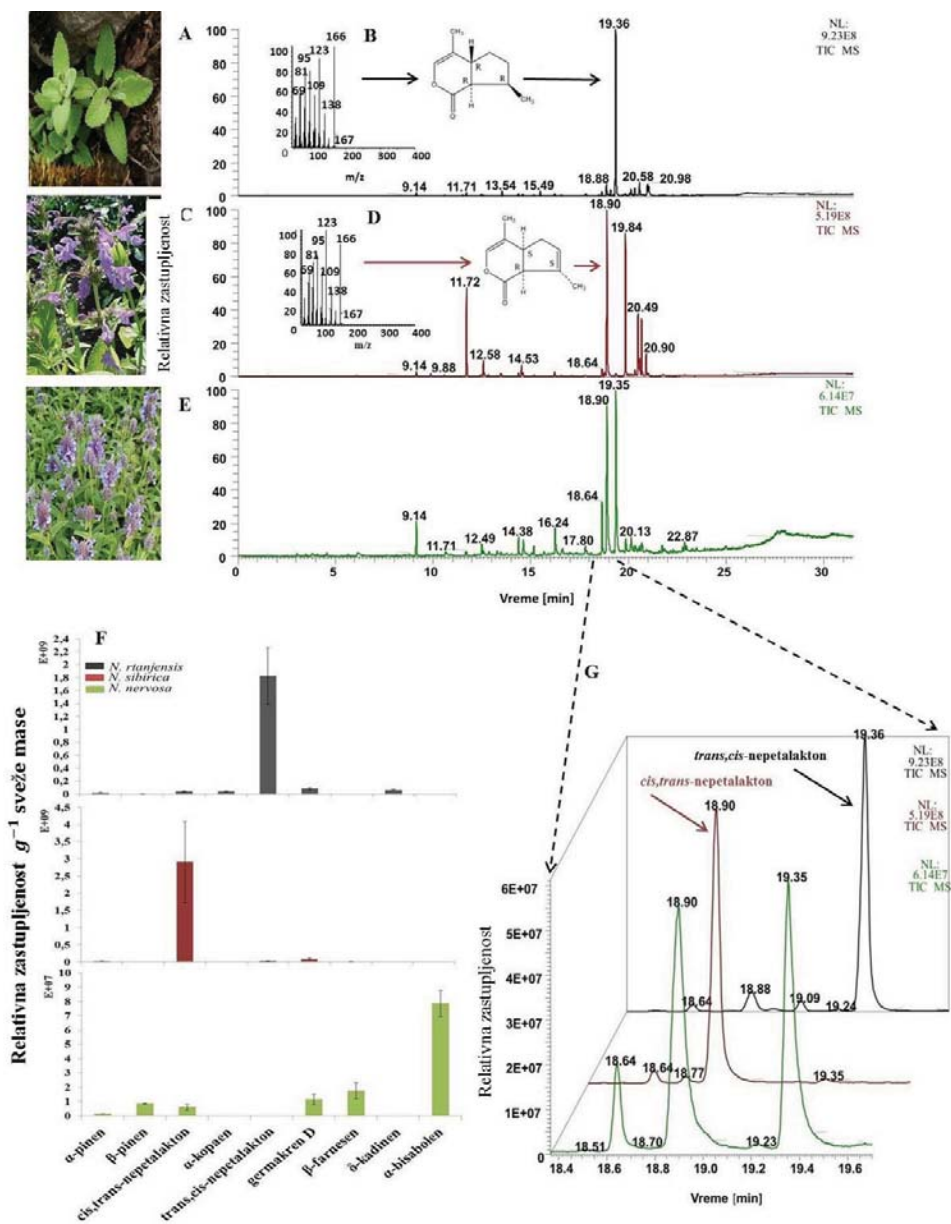


**Slika 17.** Zavisnost koncentracije nepetalaktona (*ppbV*) u atmosferi posuda za *in vitro* gajenje biljaka od broja jedinki, tj. količine biljnog materijala: A) *N. rtanjensis*; B) *N. sibirica*; C) *N. nervosa*. Analiza sadržaja ukupnih nepetalaktona je urađena PTR-MS metodom, na protonovanoj masi  $m/e$   $[M+1]^+$  od 167.

### 4.3.2. Fitohemijska karakterizacija metanolnih i dihlor-metanskih ekstrakata *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*

#### 4.3.2.1. GC-MS analiza dihlor-metanskih ekstrakata *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*

Analizom dihlor-metanskog ekstrakta *N. rtanjensis* gasnom hromatografijom sa masenim spektrometrom, detektovan je monoterpenoid nepetalakton i to *trans,cis*-stereoizomer (Slika **18A**), koji se na hromatogramu uočava kao dominantni pik ( $R_t=19.36$  minuta). Maseni spektar nepetalaktona, koji pokazuje molekularni jon na  $m/z$   $[M+H]^+$  od 167 (Slika **18B**), pokazuje dominantne fragmente od  $m/z$  166 (intenzitet 100%) i  $m/z$  123 (90%), kao u slučaju *headspace* GC-MS analize. Pored *trans,cis*-nepetalaktona, detektovane su značajno niže količine drugih monoterpenoida kao što su  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -kopaen, i *cis,trans*-nepetalakton, ali i male količine seskviterpena, uključujući germakren D i  $\delta$ -kadinen (Slika **18F**). Na GC-MS hromatogramu dihlor-metanskog ekstrakta *N. sibirica* na  $R_t=19,84$  minuta detektovano je prisustvo *cis,trans*-izomera nepetalaktona (Slika **18C**). Na masenom spektru *cis,trans*-nepetalaktona ( $m/z$   $[M+H]^+$  je 167), kao dominantni fragmenti izdvajaju se  $m/z$  123 (100%) i  $m/z$  166 (90%). U dihlor-metanskom ekstraktu *N. sibirica* detektovano je i prisustvo tragova *trans,cis*-nepetalaktona,  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena, a od seskviterpena, germakren D i  $\beta$ -farnesen takođe u tragovima (Slika **18F**). U ekstraktima *N. nervosa*, u kojima je detektovan *cis,trans*-izomer nepetalaktona u tragovima (Slika **18E**), identifikovano je prisustvo monoterpena  $\alpha$ -pinena,  $\beta$ -pinena i  $\alpha$ -kopaena. Seskviterpeni identifikovani u dihlor-metanskim ekstraktima *N. nervosa* su  $\alpha$ -bisabolen,  $\beta$ -farnesen i germakren D. Generalno je količina ispaljivih jedinjenja kod *N. nervosa* znatno manja nego kod druge dve ispitivane vrste (Slika **18F**).



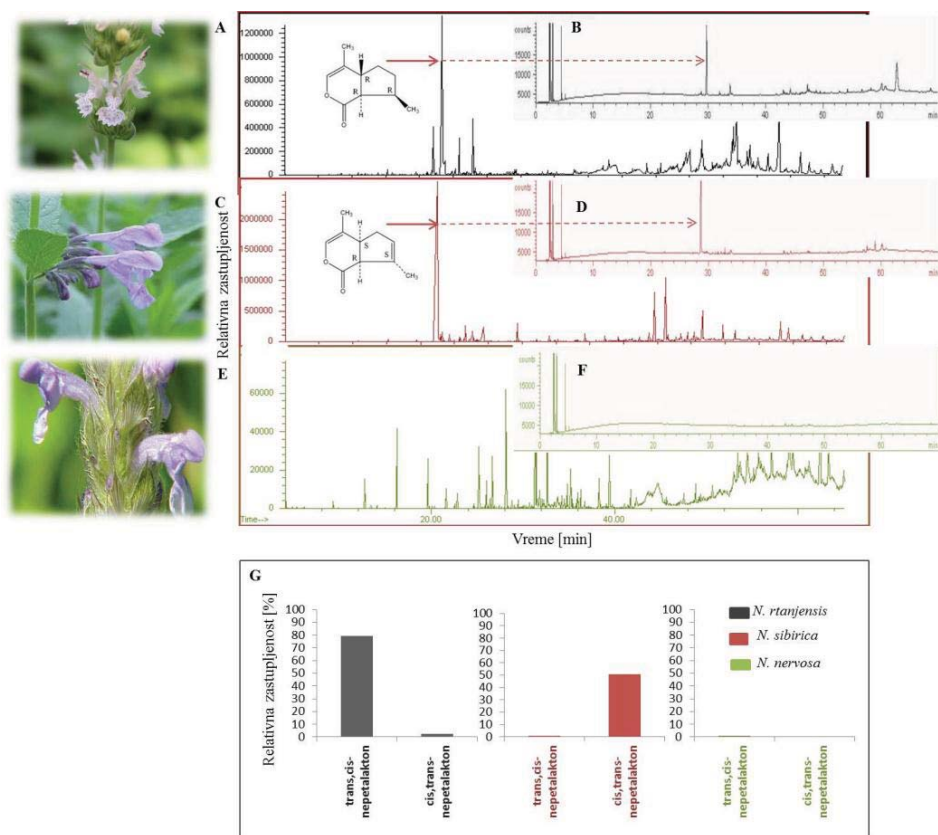
**Slika 18.** GC-MS analiza dihlor-metanskih ekstrakata *N. ratanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*: A) GC-MS hromatogram dihlor-metanskog ekstrakta *N. ratanjensis* i B) maseni spektar pika na  $R_t=19,36$  minuta, koji odgovara *trans,cis*- izomeru nepetalaktona; C) GC-MS hromatogram dihlor-metanskog ekstrakta *N. sibirica* i D) maseni spektar pika na  $R_t=18,90$  minuta, koji odgovara *cis,trans*-nepetalaktonu; E) GC-MS hromatogram dihlor-metanskog ekstrakta *N. nervosa*, nepetalakton nije detektovan; F) Relativna zastupljenost identifikovanih monoterpena i seskviterpena u dihlor-metanskim ekstraktima *N. ratanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*. Vrednosti su normalizovane u odnosu na 1 g sveže mase; G) Izdvojen i uvećan region GC-MS hromatograma, u vremenskom intervalu  $R_t$  od 18,4 do 19,7 minuta, u kome se uočavaju izomeri nepetalaktona.

#### 4.3.2.2. GC-MS i GC-FID analiza

##### metanolnih ekstrakata *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*

GC-MS analizom je utvrđeno prisustvo *trans,cis*-nepetalaktona u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis* (Slika 19A), *cis,trans*-nepetalaktona u metanolnim ekstraktima *N. sibirica* (Slika 19C), dok je u ekstraktu *N. nervosa* nepetalakton prisutan u tragovima (Slika 19E). Uočeno je jasno hromatografsko razdvajanje dva izomera nepetalaktona na različitim retencionim vremenima. Gasnom hromatografijom sa plamenojonizujućim detektorom, potvrđeno je prisustvo *trans,cis*- izomera kod *N. rtanjensis* (Slika 19B), i *cis,trans*- izomera nepetalaktona kod *N. sibirica* (Slika 19D).

Kvantifikacijom stereoizomera nepetalaktona u metanolnim ekstraktima zaključeno je da 79,19% *trans,cis*- i 2,19% *cis,trans*- stereoizomera ima u ekstraktu *N. rtanjensis*, dok ekstrakt *N. sibirica* sadrži 50,96% *cis,trans*- i samo 0,76% *trans,cis*-nepetalaktona. Nepetalakton je u veoma malim količinama (0,87% *trans,cis*- i 0,18% *cis,trans*-) kvantifikovan i u metanolnom ekstraktu *N. nervosa* (Slika 19G). Ako govorimo o ukupnom nepetalaktonu, najveći sadržaj ovog monoterpena je zabeležen kod *N. rtanjensis*.



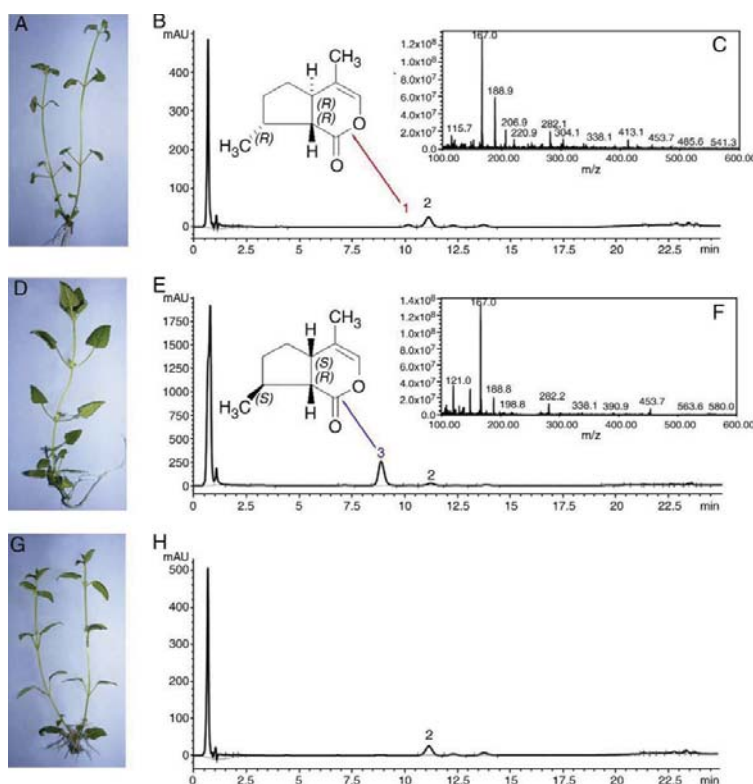
**Slika 19.** GC-MS i GC-FID analiza metanolnih ekstrakata *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*: A) GC-MS i B) GC-FID hromatogrami metanolnog ekstrakta *N. rtanjensis*; C) GC-MS i D) GC-FID hromatogrami metanolnog ekstrakta *N. sibirica*; E) GC-MS i F) GC-FID hromatogrami metanolnog ekstrakta *N. nervosa*; G) Relativna zastupljenost stereoisomera nepetalaktona u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* izražena u % u odnosu na ukupnu količinu isparljivih jedinjenja koja su detektovana u metanolnim ekstraktima.

#### 4.3.2.3. HPLC-DAD i HPLC-MS analiza metanolnih ekstrakata *N. rtanjensis*,

#### *N. sibirica* i *N. nervosa*

Sadržaj nepetalaktona u metanolnim ekstraktima nadzemnog dela *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, određen je i tačnom hromatografijom pod visokim pritiskom primenom UV detektora. Detekcija razdvojenih pikova urađena je na 225 nm (Slika 20). Prilikom kvantitativne HPLC analize korišćeni su standardni rastvori koji su pripremljeni rastvaranjem etarskog ulja *N. rtanjensis* koje je sadržalo 79,89% *trans,cis*-nepetalaktona i 6,3% *cis,trans*-nepetalaktona u metanolu. Na Slici 20B, 20E i 20H prikazani su hromatogrami metanolnih ekstrakta tri vrste roda *Nepeta*. Jedinjenja u ekstraktima su identifikovna na osnovu *Rt* razdvojenih komponenti koja su poređena sa

*Rt* standardnog jedinjenja, kao i na osnovu apsorpcionih spektara. *Trans-cis*-nepetalakton je identifikovan i kvantifikovan u metanolnom ekstraktu *N. rtanjensis* na retencionom vremenu *Rt*=10 minuta. Velika količina *cis,trans*- izomera nepetalaktona je detektovana u metanolnom ekstraktu *N. sibirica* na retencionom vremenu *Rt*=8 minuta, dok u metanolnim ekstraktima vrste *N. nervosa* nepetalaktoni nisu detektovani. Potvrda identifikacije stereoizomera nepetalaktona urađena je tačnom hromatografijom pod visokim pritiskom sa masenom spektrofotometrijom (Slika 20C 20F). Dominantni pikovi koji se javljaju na *m/z* 167 odnosno 189 odgovaraju masi nepetalaktona uvećanoj za masu vodonika  $[M+H]^+$  odnosno masi nepetalaktona uvećanoj za masu natrijuma  $[M+Na]^+$ .



**Slika 20.** Metanolni ekstrakti A) *N. rtanjensis*; D) *N. sibirica*; G) *N. nervosa*, analizirani HPLC-UV i HPLC-MS metodom. Na HPLC-UV hromatogramu (B) metanolnog ekstrakta *N. rtanjensis* uočavaju se pikovi koji predstavljaju *trans,cis*-nepetalakton (1) i geraniol (2). Prikazan je maseni spektar *trans,cis*-nepetalaktona (C) na *m/z*  $[M+H]^+$  od 167; HPLC-UV analiza metanolnog ekstrakta *N. sibirica* (E) pokazala je prisustvo *cis,trans*-nepetalaktona, koji je na hromatogramu obeležen brojem 3. Takođe je prikazan maseni spektar *cis,trans*-nepetalaktona (F) na *m/z*  $[M+H]^+$  od 167. Na HPLC-UV hromatogramu metanolnog ekstrakta *N. nervosa* (H) nije uočen nepetalakton.



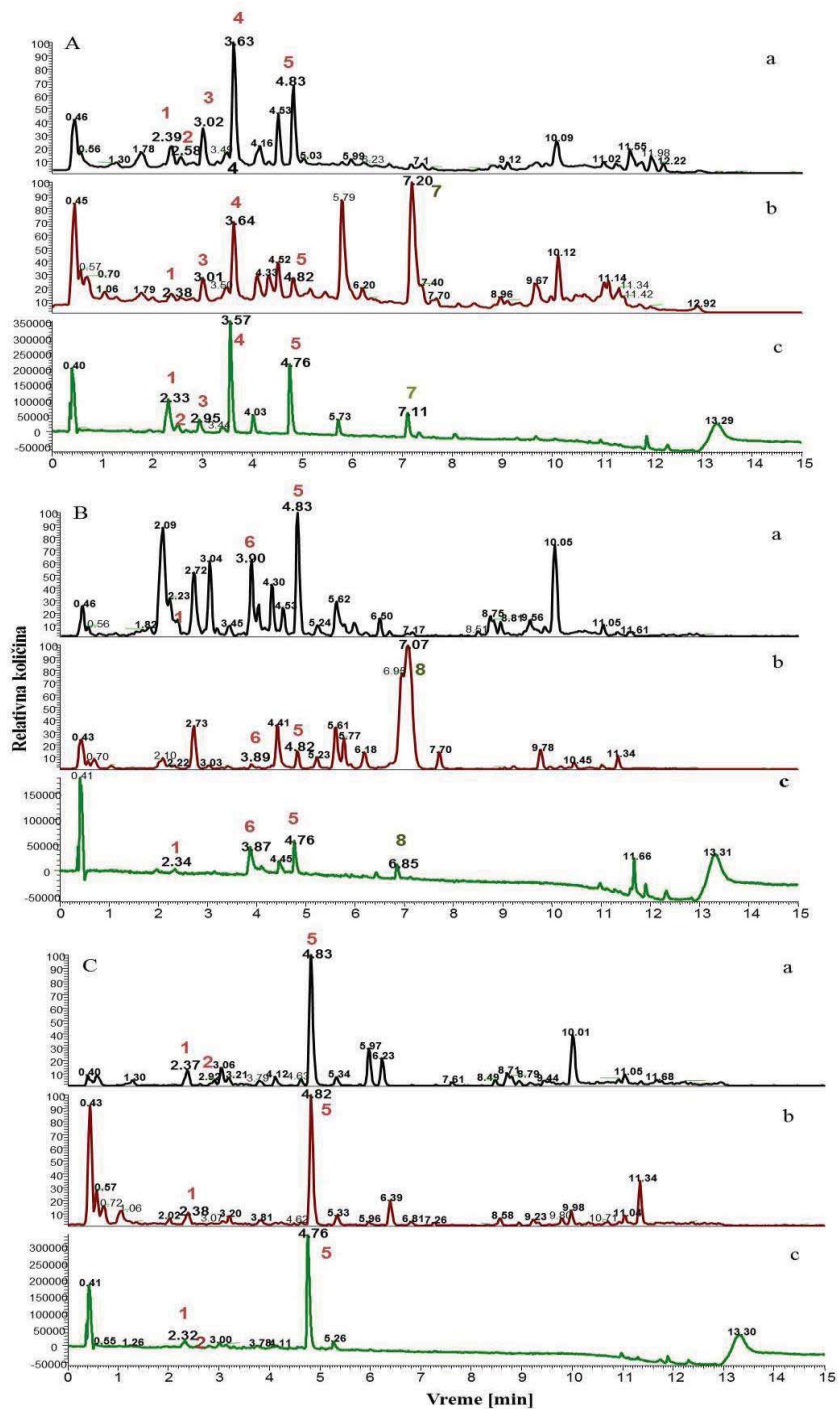
#### 4.3.2.4. UHPLC/DAD/HESI-MS/MS analiza metanolnih ekstrakata *N. ranjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*

FS UHPLC/HESI-MS spektri su dobijeni kako u pozitivnom, tako i u negativnom modalitetu, korišćenjem UHPLC gradijenta, kao što je opisano u materijalu i metodama. UHPLC/+HESI-MS i UHPLC/-HESI-MS spektralni podaci pokazuju seriju pikova u opsegu  $m/z$  od 100 do 1000.

Prilikom analize metanolnog ekstrakta *N. ranjensis*, na UHPLC/-HESI-MS hromatogramu ukupnih jona su jasno razdvojeni pikovi na  $R_t$  2.39 minuta, 2.58 minuta, 3.02 minuta, 3.63 minuta i 4.83 minuta (Slika **21A**), koji su na osnovu standarda identifikovani kao: (1)- hlorogena kiselina ( $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> je 353), (2)- kafeinska kiselina ( $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> je 179), (3)- neohlorogena kiselina ( $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> je 353), (4)-ruzmarinska kiselina 3'-O-β-D-glukozid ( $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> je 521) i (5)-ruzmarinska kiselina ( $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> je 359). Identifikacija je potvrđena FS, PIS, SRM i NLS eksperimentima.

UHPLC/-HESI-MS analiza metanolnog ekstrakta *N. sibirica* pokazala je prisustvo (1)- hlorogene kiseline, (2)- kafeinske kiseline, (5)- ruzmarinske kiseline i (6)- neidentifikovanog derivata ruzmarinske kiseline (Slika **21 B**).

U metanolnom ekstraktu *N. nervosa*, potvrđeno je prisustvo (1)- hlorogene kiseline, (2)- kafeinske kiseline u tragovima i (5) ruzmarinske kiseline, koja predstavlja dominantnu fenolnu kiselinu (Slika **21C**). Kod ove vrste nisu zabeleženi derivati ruzmarinske kiseline.



**Slika 21.** UHPLC/-HESI-MS (a), UHPLC/+HESI-MS (b) i UHPLC-DAD,  $\lambda=260\text{ nm}$  (c) hromatogrami metanolnih ekstrakata A) *N. rtanjensis* B) *N. sibirica* i C) *N. nervosa*. Identifikovana su jedinjenja: hlorogena kiselina (1), kafeinska kiselina (2), neohlorogena kiselina (3), 3'-O- $\beta$ -D-glukozid ruzmarinske kiseline (4), ruzmarinska kiselina (5), nepoznati derivat ruzmarinske kiseline (6), *trans,cis*-nepetalakton (7), *cis,trans*-nepetalakton (8).

**Tabela 5.** UHPLC/-HESI-MS/MS i UHPLC/+HESI-MS/MS karakterizacija komponenti metanolnih ekstrakata *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* korišćenjem različitih tipova skeniranja u masenoj spektrofotometriji.

Pik <sup>a</sup>	Identifikacija	-HESI-MS/MS eksperimenti					DAD podaci	
		Rt (min)	FS [M-H] <sup>-</sup> [m/z]	Produkt jon skeniranje	MS <sup>2</sup> fragmenti (m/z (relativna zastupljenost))	Neutral loss skeniranje	Rt (min)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)
1	3-O- kafeoilkininska kiselina (Hlorogena kiselina) <sup>5</sup>	2,39	353	353	<b>191</b> (100), 173 (5), 135 (10), <b>127</b> (<5)		2,33	230,330
2	Kafeinska kiselina <sup>5</sup>	2,58	179	179	135 (100), <b>134</b> ( <b>85</b> ), 132 (5), <b>117</b> ( <b>10</b> ), 109 (10), 106 (<5), 91 (5)		2,52	230,330
3	5-O- kafeoilkininska kiselina (Neohlorogena kiselina) <sup>1</sup>	3,01	353	353	<b>191</b> (100), 173 (5), 161 (<5), 135 (10), <b>127</b> (<5)		2,95	230,330
4	Ruzmarinska kiselina 3'-O- $\beta$ -D-glukozid	3,63	521	521	359 (10), 341 (15), 197 (60), 179 (<5), <b>161</b> (<5), 153 (100)	162	3,57	330
5	Ruzmarinska kiselina <sup>5</sup>	4,83	359	359	197 (5), 179 (20), <b>161</b> (100), 135 (40), <b>133</b> (50), 123 (15)		4,76	330
7	<i>Trans, cis</i> -nepetalakton	7,20	167	167	<b>111</b> (60), 105 (10), 95 (10), 93 (35), 91 (50), 83(15), 81 (15), 79 (50), <b>77</b> (100), 69 (5), 67 (10), 65 (20)		7,11	225
8	<i>Cis,trans</i> -nepetalakton	7,07	167	167	<b>111</b> (5), 105 (10), 95 (5), 93 (15), 91 (55), 81 (25), 79 (55), <b>77</b> (100), 69 (5), 67 (15), 65 (10)		6,85	225

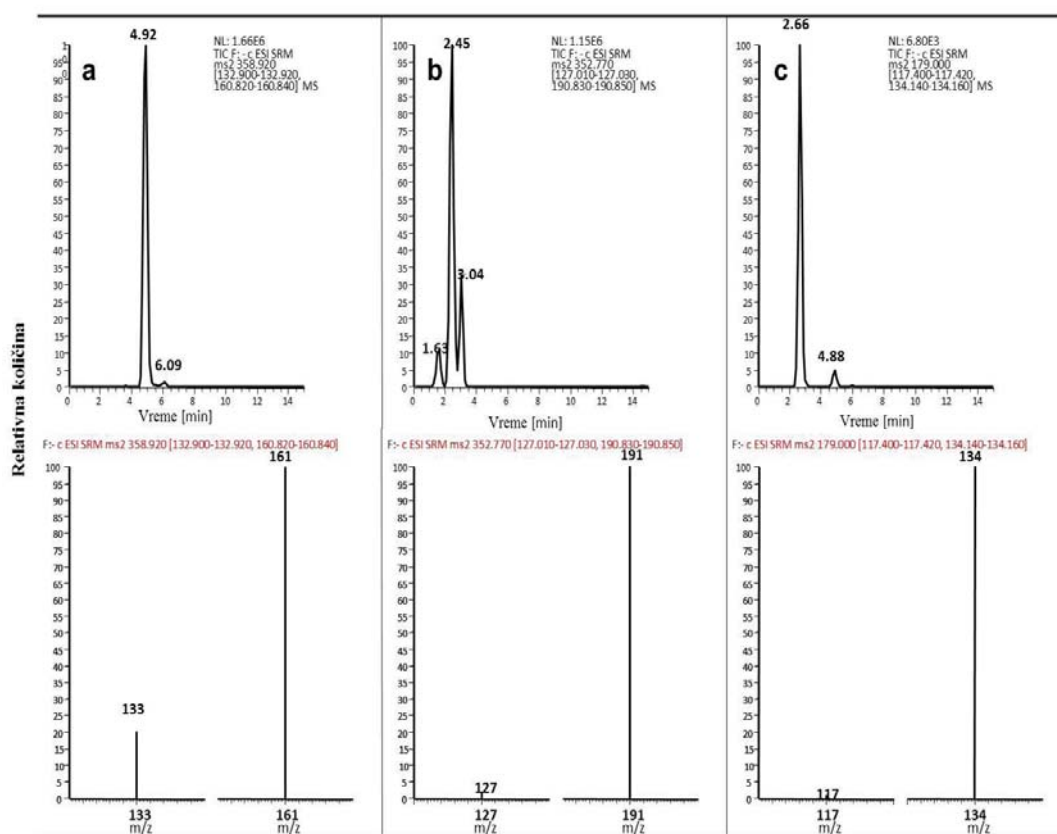
<sup>a</sup>Brojevi pikova, prema Slici 1; <sup>5</sup>Potvrđeno standardima; <sup>1</sup>Potvrđeno na osnovu literaturnih podataka; Podebljanim slovima su obeleženi MS<sup>2</sup> fragmenti koji su korišćeni u SRM eksperimentu

UHPLC/-HESI-MS analiza hlorogene kiseline (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>) pokazuje molekularni jon m/z [M-H]<sup>-</sup> od 353 (Tabela 5). HK u osnovi predstavlja estar kafeinske i kininske kiseline. Na masenom spektru produkt-jona HK uočeni su MS<sup>2</sup> fragmenti koji su prikazani u Tabeli 5.

Fragment od  $m/z$  191 je dominantni fragment (relativna zastupljenost iznosi 100%) i on odgovara elementarnom sastavu  $C_7H_{11}O_6$  usled gubitka kafeinskog dela. *MS/MS* fragmentacija ovog jona daje produkt-jon na  $m/z$  173 (5%) usled gubitka molekula vode. Produkt-jon na  $m/z$  135 odgovara elementarnom sastavu  $C_8H_7O_2$ , i nastaje zbog gubitka  $CO_2$  grupe sa kafeinske kiseline ( $m/z$  179). HK je dalje kvantifikovana u metanolnim ekstraktima tri vrste roda *Nepeta* izvođenjem *SRM* eksperimenta, u kojim su kao referentni produkt-joni izabrani  $m/z$  191 i  $m/z$  127 (Slika **22b**). Neohlorogena kiselina ( $C_{16}H_{17}O_9$ ) pokazuje isti fragmentacioni profil kao hlorogena kiselina u *PIS* eksperimentu, tako da su u *SRM* eksperimentu takođe korišćeni joni  $m/z$  191 i  $m/z$  127.

Kafeinska kiselina ( $C_9H_8O_4$ ) pokazuje molekularni jon  $m/z$   $[M-H]^-$  od 179 (Tabela **5**), dok su njeni produkt-joni na  $m/z$  135 (100%), 134 (85%), 117 (10%) i 109 (10%). Fragment od  $m/z$  135 je dominantni fragment i on odgovara elementarnom sastavu  $C_8H_7O_2$  zbog gubitka 44 Da, što se pripisuje gubitku  $CO_2$  grupe. *MS/MS* fragmentacija ovog jona daje produkt-jon na  $m/z$  117 (10%) usled gubitka molekula vode. U *SRM* eksperimentu, kao referentni produkt-joni praćeni su  $m/z$  134 i  $m/z$  117 (Slika **22c**).

Ruzmarinska kiselina ( $C_{18}H_{16}O_8$ ), koja u osnovi predstavlja estar kafeinske kiseline i 3,4-dihidroksifenil mlečne kiseline, pokazuje molekularni jon  $m/z$   $[M-H]^-$  od 359. Fragment na  $m/z$  197 nastaje usled gubitka kafeinske grupe sa molekularnog jona  $[M-162]^-$ . *MS/MS* fragmentacija jona  $m/z$  197 daje produkt-jon na  $m/z$  179 usled gubitka molekula vode. Glavni produkt-jon je uočen na  $m/z$  161 i on nastaje gubitkom molekula vode sa jona  $m/z$  179 koji odgovara kafeinskom delu ruzmarinske kiseline. Fragment od  $m/z$  135 odgovara elementarnom sastavu  $C_8H_7O_2$  i nastaje nakon gubitka  $CO_2$  grupe sa kafeinskog dela molekula  $m/z$  179. RK je dalje kvantifikovana u metanolnim ekstraktima tri vrste roda *Nepeta*, izvođenjem *SRM* eksperimenta u kome su kao referentni produkt-joni praćeni  $m/z$  161 i  $m/z$  133 joni (Slika **22a**).



**Slika 22.** SRM eksperiment za kvantifikaciju HK, KK i RK u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis*. HK je kvantifikovana izvođenjem SRM eksperimenta u kome su kao referentni produkt joni izabrani  $m/z$  191 i  $m/z$  127 (b). Predefinisani produkt joni u SRM eksperimentima za kvantifikaciju KK bili su  $m/z$  134 i  $m/z$  117 (c), a za kvantifikaciju RK  $m/z$  161 i  $m/z$  133 joni (a).

Analiza kvantitativnog sadržaja HK, KK i RK pokazala je da je RK dominantna fenolna kiselina u metanolnim ekstraktima sve tri ispitivane vrste (Tabela 6). Najveća količina RK je uočena kod *N. nervosa*, sledi *N. rtanjensis* i na kraju *N. sibirica* kod koje je prisutna za trećinu manja količina ove fenolne kiseline nego kod *N. nervosa*. Značajna količina HK prisutna je kod *N. rtanjensis*, dok je kod *N. sibirica*, i naročito kod *N. nervosa* detektovana značajno manja količina ovog jedinjenja.

**Tabela 6.** Sadržaj nekih fenolnih kiselina i nepetalaktona u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*

Br. pika	Naziv jedinjenja	Koncentracija jedinjenja [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ metanolnog ekstrakta] $\mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1}$ sveže mase		
		<i>N. rtanjensis</i>	<i>N. sibirica</i>	<i>N. nervosa</i>
1.	Hlorogena kiselina	228,506	7,357	51,752
2.	Kafeinska kiselina	6,058	3,827	12,703
5.	Ruzmarinska kiselina	296,727	136,980	391,980
7.	<i>Trans,cis</i> -nepetalakton	2657,233	/	/
8.	<i>Cis,trans</i> -nepetalakton	/	1777,719	/

Broj pikova odgovara brojevima označenim na *TIC* hromatogramima

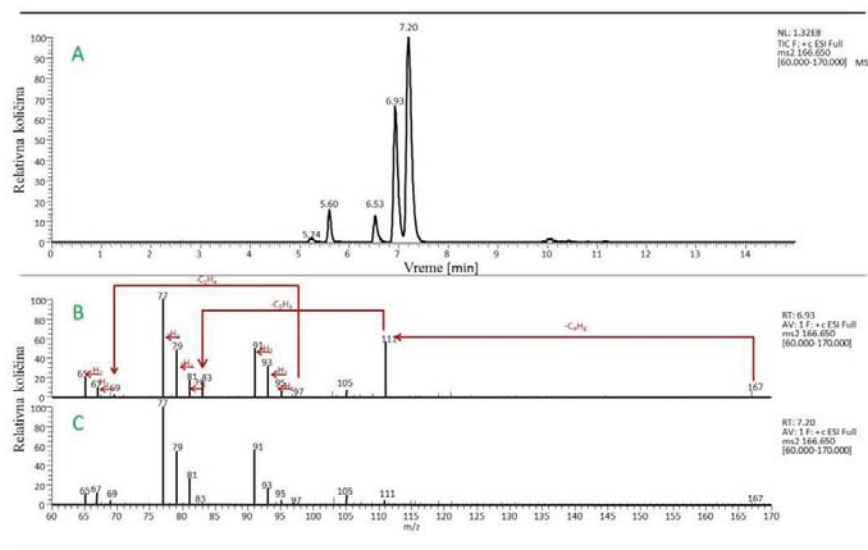
Prilikom analize metanolnog ekstrakta *N. rtanjensis*, *UHPLC/+HESI-MS* hromatogram ukupnih jona pokazuje jasno razdvojen dominantni pik na  $R_t=7.20$  minuta, (Slika **21Ab**), koji je identifikovan kao (7)- *trans,cis*-nepetalakton ( $m/z$   $[M+H]^+$  je 167), monoterpenoid koji je karakterističan za rod *Nepeta*. Kao standardi za identifikaciju izomera nepetalaktona korišćena su etarska ulja *N. rtanjensis* i *N. cataria* sa poznatim kvalitativnim i kvantitativnim sadržajem nepetalaktona. *UHPLC-DAD* hromatogram takođe pokazuje prisustvo pikova od 1 do 5 i pik 7 u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis*. Retencionna vremena i  $\lambda_{\text{max}}$  ovih jedinjenja su prikazani u Tabeli 5.

*UHPLC/+HESI-MS* analiza metanolnog ekstrakta *N. sibirica* pokazuje prisustvo drugog stereoizomera nepetalaktona u metanolnom ekstraktu. *UHPLC/+HESI-MS* hromatogram ukupnih jona pokazuje jasno razdvojen dominantni pik na  $R_t=7.07$  minuta, (Slika **21Bb**), koji je identifikovan kao monoterpenoid (8)-*cis,trans*-nepetalakton ( $m/z$   $[M+H]^+$  je 167).

U metanolnom ekstraktu *N. nervosa* *UHPLC/DAD/+HESI-MS* i *UHPLC-DAD* analizom nije potvrđeno prisustvo nepetalaktona.

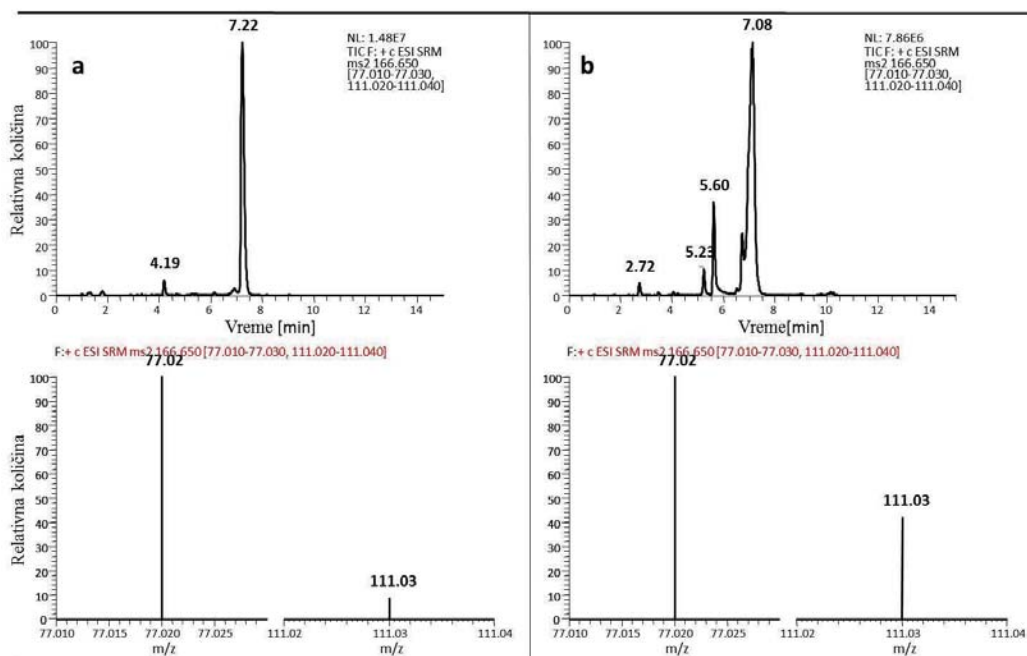
*UHPLC/+HESI-MS* analiza nepetalaktona ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$ ) pokazuje molekularni jon  $m/z$   $[M+H]^+$  od 167.

Na UHPLC/+HESI-MS/MS masenom spektru produkt-jona (Slika 23A), *trans,cis*-nepetalakton koji je identifikovan kod *N. rtanjensis* ( $R_t=7.18$  minuta), i *cis,trans*-nepetalakton, koji je identifikovan u metanolnim ekstraktima *N. sibirica* ( $R_t=6.93$  minuta), pokazuju isti fragmentacioni profil.  $MS^2$  fragmenti su prikazani u Tabeli 5. U slučaju *cis,trans*-nepetalaktona uočen je fragment  $m/z$  111 (55%) koji nastaje gubitkom  $C_4H_8$  grupe sa molekularnog jona (Slika 5B). Kod *trans,cis*- izomera (Slika 23C) ovaj fragment je znatno manjeg intenziteta (5%). Dominantan produkt-jon kod oba izomera je  $m/z$  77 (100%), a pretpostavljeni putevi fragmentacije nepetalaktona su predstavljeni na Slici 23B.



**Slika 23.** PIS (eng. *product ion scanning*) eksperiment za masu  $m/z$  167, koja odgovara molekularnom jonu  $[M+H]^+$  nepetalaktona. Kao standard je korišćeno etarsko ulje T5, sa prethodno definisanim kvalitativnim i kvantitativnim sadržajem nepetalaktona. UHPLC/+HESI-MS/MS maseni spektri produkt-jona, *trans,cis*-nepetalaktona (B) i *cis,trans*-nepetalaktona (C) pokazuju iste fragmentacione profile. Pretpostavljeni putevi fragmentacije označeni su crvenim strelicama.

Diferencijacija izomera nepetalaktona se može vršiti na osnovu retencionih vremena i odnosa jona  $m/z$  77 i  $m/z$  111, pa je kvantifikacija nepetalaktona u metanolnim ekstraktima tri vrste roda *Nepeta* urađena izvođenjem SRM eksperimenta u kome su kao referentni produkt-joni izabrani upravo  $m/z$  77 i  $m/z$  111 (Slika 24).



**Slika 24.** SRM eksperiment za kvantifikaciju nepetalaktona u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis* (a) i *N. sibirica* (b). Nepetalakton je kvantifikovan izvođenjem SRM eksperimenta u kome su kao referentni produkt joni izabrani  $m/z$  77 i  $m/z$  111.

#### 4.3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida u metanolnim ekstraktima *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*

Količina ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima nadzemnog dela tri vrste roda *Nepeta* koje su gajene u uslovima *in vitro* određena je spektrofotometrijskom metodom korišćenjem *Folin-Ciocalteu* reagensa. Dobijene vrednosti izražene su u ekvivalentima galne kiseline po *g* suve mase uzorka. Rezultati pokazuju da najveću količinu fenolnih jedinjenja sadrži ekstrakt *N. rtanjensis* zatim *N. nervosa*, dok najmanju količinu fenolnih jedinjenja sadrži ekstrakt *N. sibirica*. (Tabela 7). Ukupni flavonoidi u metanolnim ekstraktima *Nepeta* su određeni spektrofotometrijski, a koncentracija ukupnih flavonoida je dobijena izračunavanjem iz kalibracione krive rutin hidrata. Rezultati pokazuju da najveću količinu flavonoida sadrži ekstrakt *N. rtanjensis* dok najmanju količinu flavonoida sadrži ekstrakt *N. sibirica* (Tabela 7).



**Tabela 7.** Količina ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u metanolnim ekstraktima tri vrste roda *Nepeta*.

vrsta	<i>N. rtanjensis</i>	<i>N. sibirica</i>	<i>N. nervosa</i>
Ukupni fenoli [ <i>mmol EGA g-1</i> ]	17,59 <sup>b</sup>	13,02 <sup>a</sup>	13,94 <sup>a</sup>
Ukupni flavonoidi [ <i>mmol RE g-1</i> ]	1,02 <sup>c</sup>	0,56 <sup>a</sup>	0,78 <sup>b</sup>

#### 4.4. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata nadzemnog dela *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* koje su rasle u uslovima *in vitro*, određena je primenom različitih metoda (neutralizacija *DPPH* radikala, neutralizacija *ABTS*<sup>+</sup> radikala i određivanje redukcionne sposobnosti). Takođe je urađena i antioksidativna aktivnost dominantnih monoterpenskih i fenolnih jedinjenja koja su prisutna kod ispitivanih vrsta:  $\alpha$ -pinena,  $\beta$ -pinena, etarskog ulja koje sadrži 73% *trans,cis*-nepetalaktona (etarsko ulje *N. rtanjensis*), etarskog ulja koje sadrži 90% *cis,trans*-nepetalaktona (etarsko ulje *N. cataria*) kao i ruzmarinske i hlorogene kiseline.

##### 4.4.1. Antioksidativna aktivnost ispitivana *DPPH* metodom

*DPPH* antioksidativni test se najčešće koristi za određivanje sposobnosti sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktima pojedinih biljaka da predaju vodonikov atom slobodnim radikalima. Zbog nesparenih elektrona, molekul *DPPH* apsorbuje svetlost na talasnoj dužini od 517 nm.

Pri sparivanju elektrona u molekulu *DPPH* pod dejstvom antioksidanasa, apsorpcija na ovoj talasnoj dužini opada. *DPPH* test se često primenjuje zbog tačnosti metode, kao i komercijalne dostupnosti *DPPH* reagensa. U Tabeli 8 su prikazane *IC*<sub>50</sub> vrednosti (koncentracije potrebne za neutralizaciju 50% *DPPH* radikala, kao i antioksidativni kapacitet ekvivalenta troloksa (*TEAC*) ispitivanih metanolnih ekstrakata.

**Tabela 8.** Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata nadzemnog dela *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, etarskog ulja koje sadrži 73% *trans,cis*-nepetalaktona, etarskog ulja koje sadrži 90% *cis,trans*-nepetalaktona, ruzmarinske i hlorogene kiseline. Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$  vrednost i *TEAC*. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) prema Fišerovom *LSD* testu.

Vrsta		DPPH	ABTS <sup>+</sup>	FRAP
<i>N. rtanjensis</i>	$IC_{50}$ [mmol TE/g suve mase]	1,329 <sup>b</sup>	1,164 <sup>b</sup>	
	<i>TEAC</i> [mmol TE/g suve mase]	0,835 <sup>b</sup>	1,073 <sup>b</sup>	2,939 <sup>b</sup>
<i>N. sibirica</i>	$IC_{50}$ [mmol TE/g suve mase]	1,417 <sup>b</sup>	1,373 <sup>c</sup>	
	<i>TEAC</i> [mmol TE/g suve mase ]	0,768 <sup>a</sup>	0,706 <sup>a</sup>	1,935 <sup>a</sup>
<i>N. nervosa</i>	$IC_{50}$ [mmol TE/g suve mase]	0,937 <sup>a</sup>	0,816 <sup>a</sup>	
	<i>TEAC</i> [mmol TE/g suve mase]	0,870 <sup>b</sup>	1,217 <sup>c</sup>	2,968 <sup>b</sup>
<i>trans,cis</i> -nepetalakton	$IC_{50}$ [mmol TE/g]	0,717 <sup>c</sup>	0,602 <sup>c</sup>	
	<i>TEAC</i> [mmol TE/g]	17,016 <sup>a</sup>	0,806 <sup>a</sup>	/
<i>cis,trans</i> -nepetalakton	$IC_{50}$ [mmol TE/g]	1,155 <sup>d</sup>	0,753 <sup>d</sup>	
	<i>TEAC</i> [mmol TE/g]	13,678 <sup>a</sup>	0,706 <sup>a</sup>	/
ružmarinska kiselina	$IC_{50}$ [mmol TE/mg]	0,393 <sup>a</sup>	0,232 <sup>a</sup>	
	<i>TEAC</i> [mmol TE/mg]	40,326 <sup>c</sup>	1,695 <sup>b</sup>	1,523 <sup>a</sup>
hlorogena kiselina	$IC_{50}$ [mmol TE/mg]	0,628 <sup>b</sup>	0,394 <sup>b</sup>	
	<i>TEAC</i> [mmol TE/mg]	23,311 <sup>b</sup>	0,823 <sup>a</sup>	1,403 <sup>a</sup>

Poređenjem  $IC_{50}$  vrednosti metanolnih ekstrakata u *DPPH* testu, primećena je veća antioksidativna aktivnost metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *N. nervosa* ( $IC_{50NN} = 0,937 \text{ mmol TE g}^{-1}$  suve mase), u poređenju sa  $IC_{50}$  vrednostima metanolnih ekstrakata *N. rtanjensis* i *N. sibirica* između kojih nema statistički značajne razlike ( $IC_{50NR} = 1,329 \text{ mmol TE g}^{-1}$  suve mase;  $IC_{50NS} = 1,417 \text{ mmol TE g}^{-1}$  suve mase). Poređenjem vrednosti za *TEAC* ispitivanih ekstrakata najslabiji antioksidativni potencijal pokazuje ekstrakt vrste *N. sibirica*, dok ekstrakti *N. rtanjensis* i *N. nervosa* pokazuju sličnu antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost ekstrakata je poređena i sa antioksidativnim kapacitetom dominantnih monoterpenskih i fenolnih jedinjenja prisutnih u ispitivanim vrstama (Tabela 8).

Poređenjem koncentracija potrebnih za neutralizaciju 50% *DPPH* radikala, uočava se da veći antioksidativni kapacitet imaju fenolne kiseline u poređenju sa monoterpenskim laktonima, *trans,cis*- i *cis,trans*-nepetalaktonom. Monoterpeni,  $\alpha$ -pinen i  $\beta$ -pinen, nisu pokazali antioksidativni potencijal, pa rezultati nisu predstavljeni u tabeli. Poređenjem antioksidativne aktivnosti fenolnih kiselina, koje su najzastupljenije komponente u metanolnim ekstraktima sve tri ispitivane vrste, uočava se da ruzmarinska kiselina ima veću antioksidativnu aktivnost ( $IC_{50}=0,393 \text{ mmol TE mg}^{-1}$ ) od hlorogene kiseline ( $IC_{50} = 0,628 \text{ mmol TE mg}^{-1}$ ). Takođe, rezultati pokazuju da oba izomera nepetalaktona imaju znatno nižu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa fenolnim kiselinama. *Trans,cis*-nepetalakton je pokazao veći antioksidativni potencijal ( $IC_{50}=0,717 \text{ mmol TE g}^{-1}$  suve mase uzorka), u poređenju sa *cis,trans*-nepetalaktonom ( $IC_{50}=1,155 \text{ mmol TE g}^{-1}$  suve mase uzorka). Poređenjem vrednosti dobijenih za *TEAC* potvrđeno je snažno antioksidativno delovanje fenolnih kiselina, kao i jača aktivnost *trans,cis*- u poređenju sa *cis,trans*- stereoizomerom nepetalaktona.

#### 4.4.2. Sposobnost neutralizacije $ABTS^+$ radikal katjona

U Tabel 8 su prikazane  $IC_{50}$  i *TEAC* vrednosti metanolnih ekstrakta tri vrste roda *Nepeta* kao i analiziranih referentnih jedinjenja. Metanolni ekstrakti biljaka su pokazali značajnu sposobnost neutralizacije  $ABTS^+$  radikal katjona, te samim tim i antioksidativnu aktivnost. Najveću sposobnost neutralizacije pokazuje metanolni ekstrakt vrste *N. nervosa* ( $IC_{50}=0,816$ ;  $TEAC=1,217 \text{ mmol TE g}^{-1}$  suve mase uzorka), a najmanju ekstrakt *N. sibirica* ( $IC_{50}=1,373$ ;  $TEAC=0,706 \text{ mmol TE g}^{-1}$  suve mase). Ruzmarinska kiselina, hlorogena kiselina, *trans,cis*- i *cis,trans*-nepetalakton pokazali su sposobnost neutralizacije  $ABTS^+$  radikal katjona sa  $IC_{50}$  i *TEAC* vrednostima koje se međusobno statistički značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ), pri čemu su kao u *DPPH* testu fenolne kiseline pokazale veću antioksidativnu aktivnost nego monoterpeni. Najveću antioksidativnu aktivnost pokazala je ruzmarinska kiselina ( $IC_{50}=0,232 \text{ mmol TE mg}^{-1}$ ;  $TEAC=1,695 \text{ mmol TE mg}^{-1}$ ), dok je najmanju aktivnost pokazao *cis,tran*-nepetalakton ( $IC_{50}=0,706$ ;  $TEAC=0,753 \text{ mmol TE g}^{-1}$ ). Monoterpeni  $\alpha$ -pinen i  $\beta$ -pinen ne pokazuju sposobnost neutralizacije  $ABTS^+$ .

#### 4.4.3. Fe<sup>3+</sup>/ Fe<sup>2+</sup> redoks kapacitet (*FRAP*) test

Najmanju sposobnost redukcije Fe<sup>3+</sup> pokazuje metanolni ekstrakt *N. sibirica* ( $TEAC=1,935 \text{ mmol TE g}^{-1}$  suve mase uzorka), dok nije uočena statistički značajna razlika između metanolnih ekstrakta *N. rtanjensis* i *N. nervosa* ( $TEAC_{NR}=2,939 \text{ mmol TE g}^{-1}$  suve mase;  $TEAC_{NS}=2,968 \text{ mmol TE g}^{-1}$  suve mase) (Tabela 8).

*FRAP* testom je pokazano da etarsko ulje *N. rtanjensis*, kao i etarsko ulje koje kao dominantno jedinjenje sadrži *cis,trans*-nepetalakton ne pokazuju sposobnost redukcije Fe<sup>3+</sup> (Tabela 8). Takođe, monoterpeni  $\alpha$ -pinen i  $\beta$ -pinen nisu pokazali redukujuću aktivnost prema Fe<sup>3+</sup>. Ruzmarinska kiselina je, kao i u prethodnim antioksidativnim testovima pokazala najveći potencijal predaje elektrona i prevođenja Fe<sup>3+</sup> u Fe<sup>2+</sup>.

#### 4.5. Antimikrobno dejstvo

Antimikrobno dejstvo metanolnih ekstrakta *Nepeta rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* na određene vrste bakterija i gljiva ispitivano je primenom mikrodilucione metode sa ciljem određivanja minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta koja inhibira rast mikroorganizama (*MIC*).

Ukoliko nije bilo rasta, te koncentracije uzimane su kao minimalna baktericidna i minimalna fungicidna koncentracija (*MBC* i *MFC*). Aktivnost ekstrakata je upoređena sa referentnim antibiotikom streptomycinom, kada je testiranje rađeno na bakterijskim vrstama, odnosno sa komercijalnim fungicidima bifonazolom i ketokonazolom u slučaju antifungalnog ispitivanja. Rezultati antibakterijskog i antifungalnog dejstva metanolnog ekstrakta tri vrste roda *Nepeta* predstavljeni su u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Minimalna inhibitorna (*MIC*) i letalna koncentracija (*MBC*-baktericidna i *MFC*-fungicidna koncentracija) metanolnog ekstrakta tri vrste roda *Nepeta*

		<i>N. nervosa</i> <i>MIC-MBC</i> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	<i>N. rtanjensis</i> <i>MIC-MBC</i> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	<i>N. sibirica</i> <i>MIC-MBC</i> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	<i>Streptomycin</i> <i>MIC-MBC</i> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]		
<b>Bakterije</b>	<i>Bacillus cereus</i>	50-100	50-100	100-200	12.5-25.0		
	<i>Micrococcus flavus</i>	50-100	50-100	100-200	25.0-50		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	50-100	50-100	100-200	50-100		
	<i>Escherichia coli</i>	100-200	50-100	100-200	50-100		
	<i>Pseudomonas aerginosa</i>	100-200	50-100	100-200	50-100		
	<i>Enterobacter cloacae</i>	100-200	50-100	100-200	50-100		
	<i>Salmonella typhimurium</i>	100-200	50-100	-	50-100		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	100-200	50-100	-	150-300		
			<i>N. nervosa</i> <i>MIC-MFC</i> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	<i>N. rtanjensis</i> <i>MIC-MFC</i> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	<i>N. sibirica</i> <i>MIC-MFC</i> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	<i>Bifonazol</i> <i>MIC-MFC</i> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	<i>Ketokonazol</i> <i>MIC-MFC</i> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]
	<b>Gjive</b>	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	75-100	75-100	75-100	100-200	200-500
<i>Fulvia fulvum</i>		100-200	75-100	100-200	100-200	200-500	
<i>Trichoderma viride</i>		50-75	25-75	25-75	200-250	2500-3000	
<i>Penicillium ochrocloron</i>		75-100	25-100	75-100	150-200	1000-1000	
<i>Penicillium funiculosum</i>		75-100	25-50	50-75	200-250	200-500	
<i>Aspergillus ochraceus</i>		75-100	50-75	75-100	150-200	1500-2000	
<i>Aspergillus flavus</i>		50-75	50-75	50-75	150-200	1500-2000	
<i>Aspergillus fumigatus</i>		75-100	75-100	75-100	150-200	200-500	

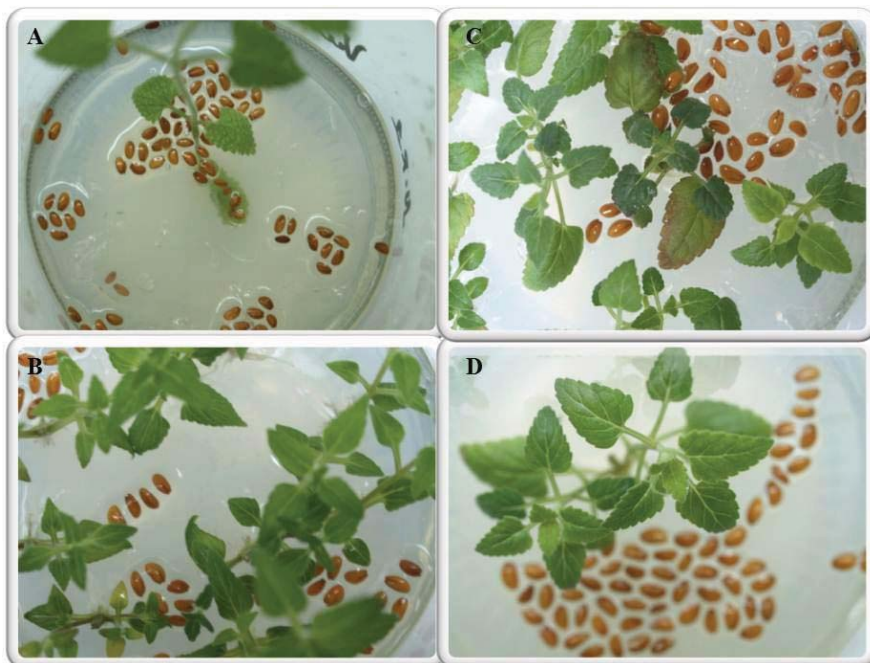
Metanolni ekstrakt sve tri vrste roda *Nepeta* pokazuju značajnu antibakterijsku aktivnost na sve testirane bakterijske vrste, pri čemu je ekstrakt *N. rtanjensis* pokazao najveću antibakterijsku aktivnost, sa *MIC* vrednostima od  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  i *MBC* vrednostima od  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Metanolni ekstrakt *N. nervosa*, u zavisnosti od bakterijske vrste pokazao je antibakterijsku aktivnost sa *MIC* vrednostima između 50 i  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  i *MBC* vrednostima između 100 i  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ , dok je ekstrakt *N. sibirica* prema svim testiranim bakterijama pokazao *MIC* vrednost od  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  i *MBC* vrednost od  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Ekstrakt *N. rtanjensis* i komercijalni antibiotik streptomycin pokazuju sličnu antibakterijsku aktivnost. Metanolni ekstrakti *N. nervosa* i *N. rtanjensis* su pokazali jače antibakterijsko dejstvo na sojeve bakterija *Listeria monocytogenes* nego komercijalni antibiotik, dok je antibakterijsko dejstvo ekstrakta *N. rtanjensis* na *Bacillus cerus* slabije od streptomicina. Ekstrakt *N. sibirica* nije pokazao antibakterijsko dejstvo na sojeve bakterija *Salmonella typhimurium* i *L. monocytogenes*.

Sva tri metanolna ekstrakta pokazuju veoma dobru sposobnost u sprečavanju rasta gljiva, od deset do trideset puta jaču od komercijalnih antifungalnih supstanci. *MIC* vrednosti metanolnih ekstrakata variraju u zavisnosti od vrste gljiva, i kreću se između 50 i 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  za metanolni ekstrakt *N. nervosa*, između 25 i 75  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kod ekstrakta vrste *N. rtanjensis* i između 25 i 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  u slučaju metanolnog ekstrakta *N. sibirica*. Najbolje fungicidno dejstvo, sa *MFC* vrednostima između 50 i 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  pokazao je metanolni ekstrakt *N. rtanjensis*.

#### 4.6. Uticaj isparljivih jedinjenja tri vrste roda *Nepeta sp.* na klijanje i rast test vrste *Lepidium sativum* L. (kres)

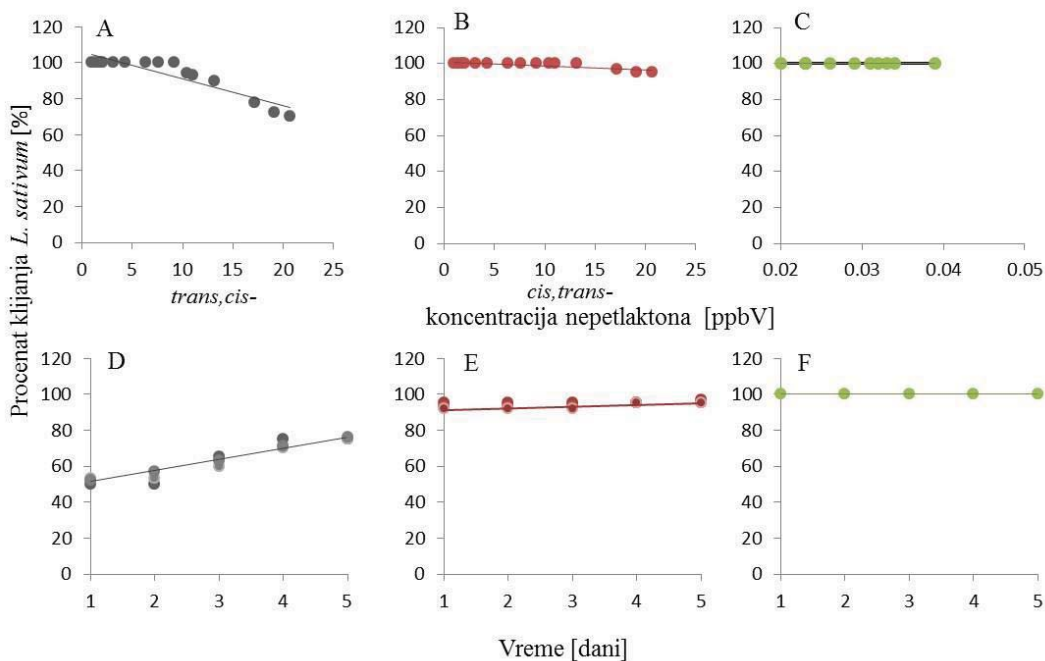
Četiri nedelje stare *in vitro* gajene biljke *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* (1, 3, 5, 7 ili 9 jedinki), ko-kultivisane su sa po trideset semena *Lepidium sativum* L. (Slika 25).



**Slika 25.** A) Ko-kultura jedne jedinke *N. rtanjensis* i *L. sativum*; B) Ko-kultura devet jedinki *N. nervosa* i *L. sativum*; C) Ko-kultura devet jedinki *N. sibirica* i *L. sativum*; D) Ko-kultura jedne jedinke *N. sibirica* i *L. sativum*.

Koncentracija nepetalaktona u atmosferi posude u kojoj su biljke rasle izmerena je pomoću *PTR-MS* uređaja. Rezultati pokazuju da srazmerno broju jedinki raste i koncentracija nepetalaktona u atmosferi posude za gajenje biljaka (Slika 17A 17B), osim u slučaju *N. nervosa* gde je nepetalakton detektovan u tragovima (Slika 17C). U atmosferi *in vitro* kultura *N. rtanjensis* izmerena je koncentracija nepetalaktona u opsegu od 5 do 23 *ppbV*, u zavisnosti od broja jedinki (Slika 17A). Sličan opseg koncentracija, od 3 do 25 *ppbV*, izmeren je u atmosferi posude za *in vitro* kulturu *N. sibirica* (Slika 17B), dok je u slučaju *N. nervosa* detektovana jako niska koncentracija nepetalaktona, na pragu detekcije *PTR-MS* uređaja (Slika 17C).

Semena *L. sativum* iskljavana su u koncentracionom gradijentu nepetalaktona, kako bi se uočila zavisnost procenta klijanja od koncentracije ovog monoterpena. Semena kresa su klijala i rasla u atmosferi isparljivih jedinjenja *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* tokom pet dana, nakon čega je prebrojan broj prokljalih semena (Slika 26A 26B 26C), kao i dužina nadzemnog dela i korena klijanaca (Slika 28A 28F). Takođe je praćena dinamika klijanja kresa tokom pet dana, počev od trenutka formiranja ko-kulture (Slika 26D 26E 26F).

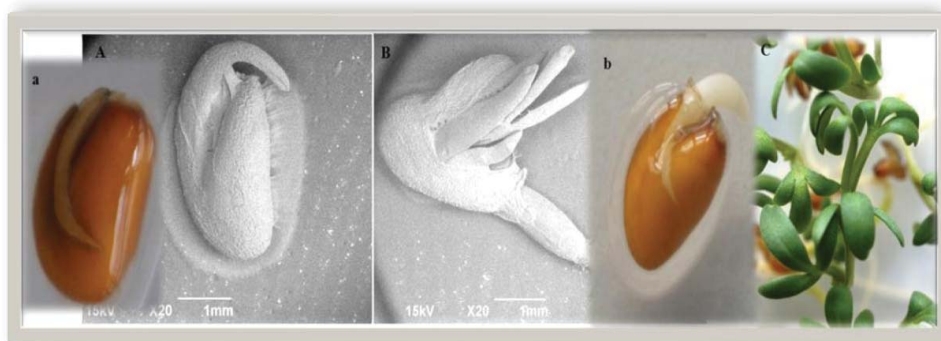


**Slika 26.** A-C) Procentat klijanja *Lepidium sativum* posle pet dana rasta u ko-kulturi, u zavisnosti od koncentracije nepetalaktona u atmosferi posude za *in vitro* gajenje A) *N. rtanjensis* B) *N. sibirica* C) *N. nervosa* D-E) Procentat klijanja *L. sativum* po danima u ko-kulturi sa D) *N. rtanjensis* E) *N. sibirica* F) *N. nervosa*. Kada su semena *L. sativum* iskljavana bez prisustva *Nepeta*, dobijena vrednost klijanja semena je 100% (rezultati nisu prikazani na graficima).

Rezultati pokazuju da sa povećanjem koncentracije nepetalaktona u atmosferi posuda za gajenje biljaka opada procentat klijanja semena *L. sativum*, naročito u slučaju ko-kultivacije sa *N. rtanjensis* koja se karakteriše prisustvom *trans,cis-* izomera nepetalaktona (Slika 26A). Inhibitorni efekat na klijanje su pokazale koncentracije *trans,cis-* nepetalaktona u opsegu od 10 do 25 ppbV, pri čemu su najjače koncentracije ovog izomera smanjile broj prokljalih semena *L. sativum* do 67%.

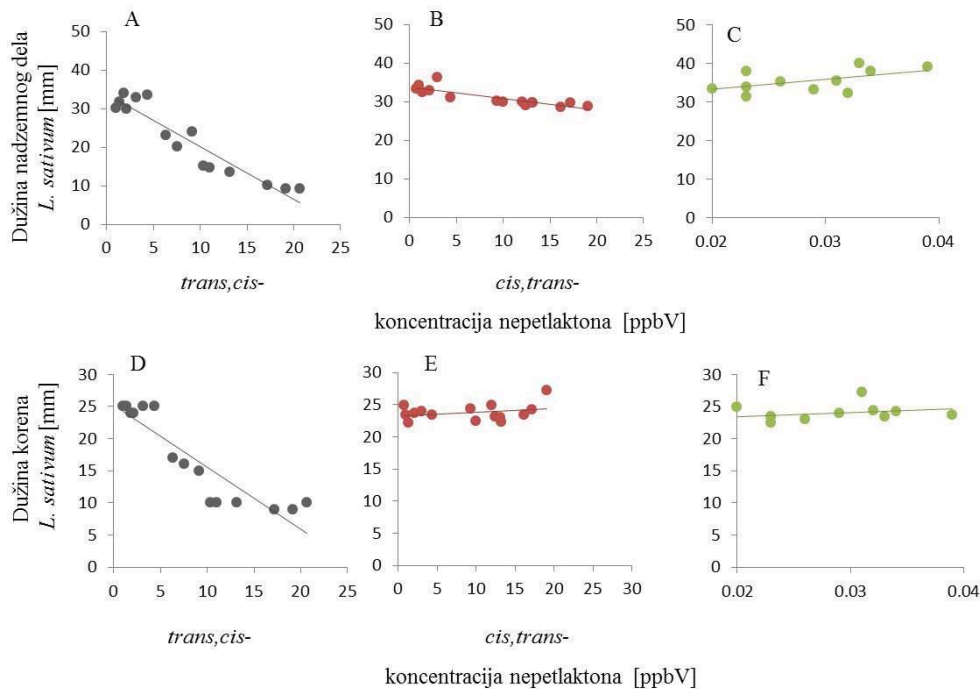


Isti opseg koncentracija nepetalaktona u ko-kulturi sa vrstom *N. sibirica*, kod koje je dominantni izomer *cis,trans*-nepetalakton, imao je manje izraženo inhibitorno dejstvo na klijanje semena kresa, smanjujući procenat klijanja na oko 90% (Slika 26B). U ko-kulturi *N. nervosa* i *L. sativum* nepetalakton je zabeležen samo u tragovima, a prisustvo niske koncentracije ovog monoterpena nije se odrazilo na klijanje semena kresa (Slika 26C). Rezultati su upoređivani sa kontrolnom grupom semena kresa koja nisu rasla u ko-kulturi sa vratama roda *Nepeta*, čiji je procenat klijanja semena iznosio 100% 18 sati od postavke eksperimenta. Na Slici 27 prikazani su kontrolni klijanci kresa stari 18 sati, 24 sata i klijanci kresa stari pet dana.



Slika 27. SEM klijanca *L. sativum* starog A) 18 sati B) 24 sata C) pet dana, gajenih u kulturi *in vitro*

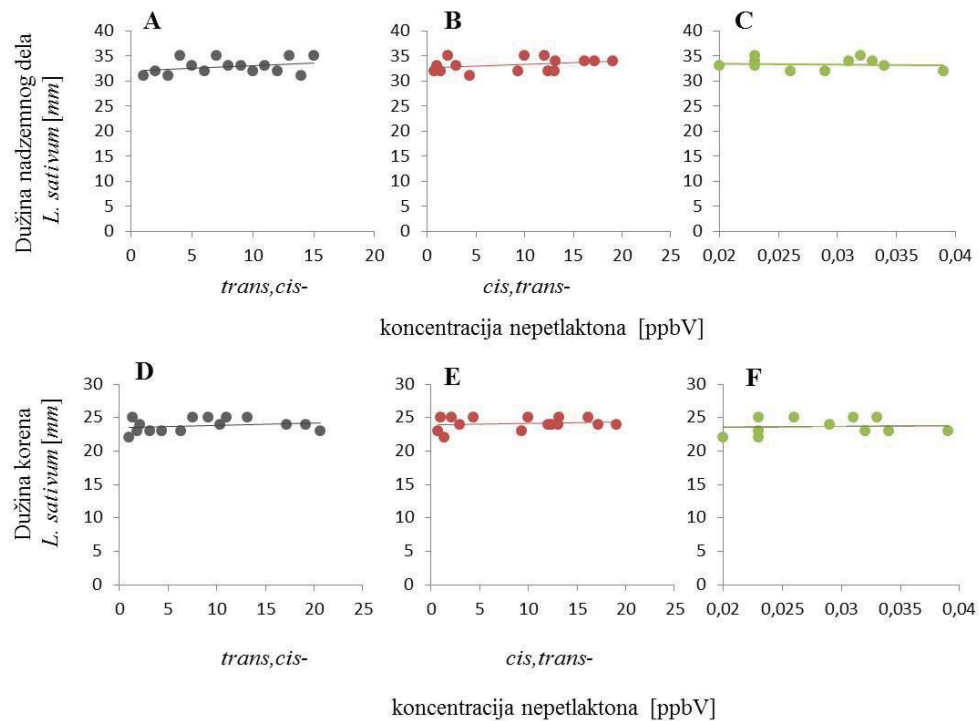
Praćenjem dinamike klijanja semena kresa, tokom pet dana ko-kultivisanja sa *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, uočeno je da semena u atmosferi *trans,cis*-nepetalaktona značajno zaostaju u klijanju (Slika 26D). Na kraju petog dana ukupan broj prokljalih semena iznosio je 69%. Semena su u atmosferi *cis,trans*-nepetalaktona (ko-kultura sa *N. sibirica*) već drugog dana dostigla visok procenat klijanja od 93% (Slika 26E), dok su semena u ko-kulturi sa *N. nervosa* nakon jednog dana prokljajala 100%, što je odgovaralo kontrolnoj grupi (Slika 26F). Rezultati su takođe ukazali na usporenu dinamiku klijanja semena kresa tokom njihovog ko-kultivisanja sa *N. sibirica* i *N. rtanjensis*. Posle petog dana ko-kultivisanja određena je dužina nadzemnog dela, kao i korena klijanaca kresa (Slika 28).



**Slika 28.** Promena dužine nadzemnog dela i korena klijanaca *L. sativum* u zavisnosti od koncentracije nepetalaktona u ko-kulturama sa: **A i D)** *N. rtanjensis* **B i E)** *N. sibirica* **C i F)** *N. nervosa*.

Niske koncentracije *trans,cis*-nepetalaktona, do približno 5 ppbV, ne utiču na rastenje i razviće klijanaca kresa, pa su dužine nadzemnih delova i korenova u opsegu vrednosti koje su izmerene kod kontrolnih biljaka. Sa daljim porastom koncentracije *trans,cis*-nepetalaktona u ko-kulturama sa *N. rtanjensis* dolazi do značajnog opadanja dužine nadzemnih delova i korenova klijanaca kresa (Slika **28A 28D**). Sa porastom koncentracija *cis,trans*-nepetalaktona uočeno je neznatno smanjenje dužine nadzemnog dela klijanaca (Slika **28B 28E**), dok efekat na rastenje i izduživanje korenova nije primećen u ko-kulturi sa *N. nervosa*. Klijanci kresa su se normalno razvijali, i nisu pokazali značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu (Slika **28C 28F**).

Da bi se utvrdilo da li je smanjenje dužine nadzemnih delova i korenova klijanaca posledica usporene dinamike klijanja semena, urađen je eksperiment u kome su semena kresa prethodno isključena, a zatim su klijanci stari tri dana ko-kultivisani sa *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* (Slika **29 A-F**).



**Slika 29.** Ko-kultivacija tri dana starih klijanaca kresa sa *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* **A** i **D**) *trans,cis*-nepetalakton **B** i **E**) *cis,trans*- nepetalakton **C** i **F**) nepetalakton nije detektovan.

Posećna dužina klijanaca starih tri dana bila je oko 20 mm. Nakon tri dana ko-kultivacije sa *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* nije zabeležena razlika u dužini nadzemnih delova ili korenova klijanaca između tretmana. Time je potvrđena pretpostavka da su uočene razlike u dužini nadzemnih delova i korenova klijanaca gajenih u atmosferi nepetalaktona posledica usporene dinamike klijanja.

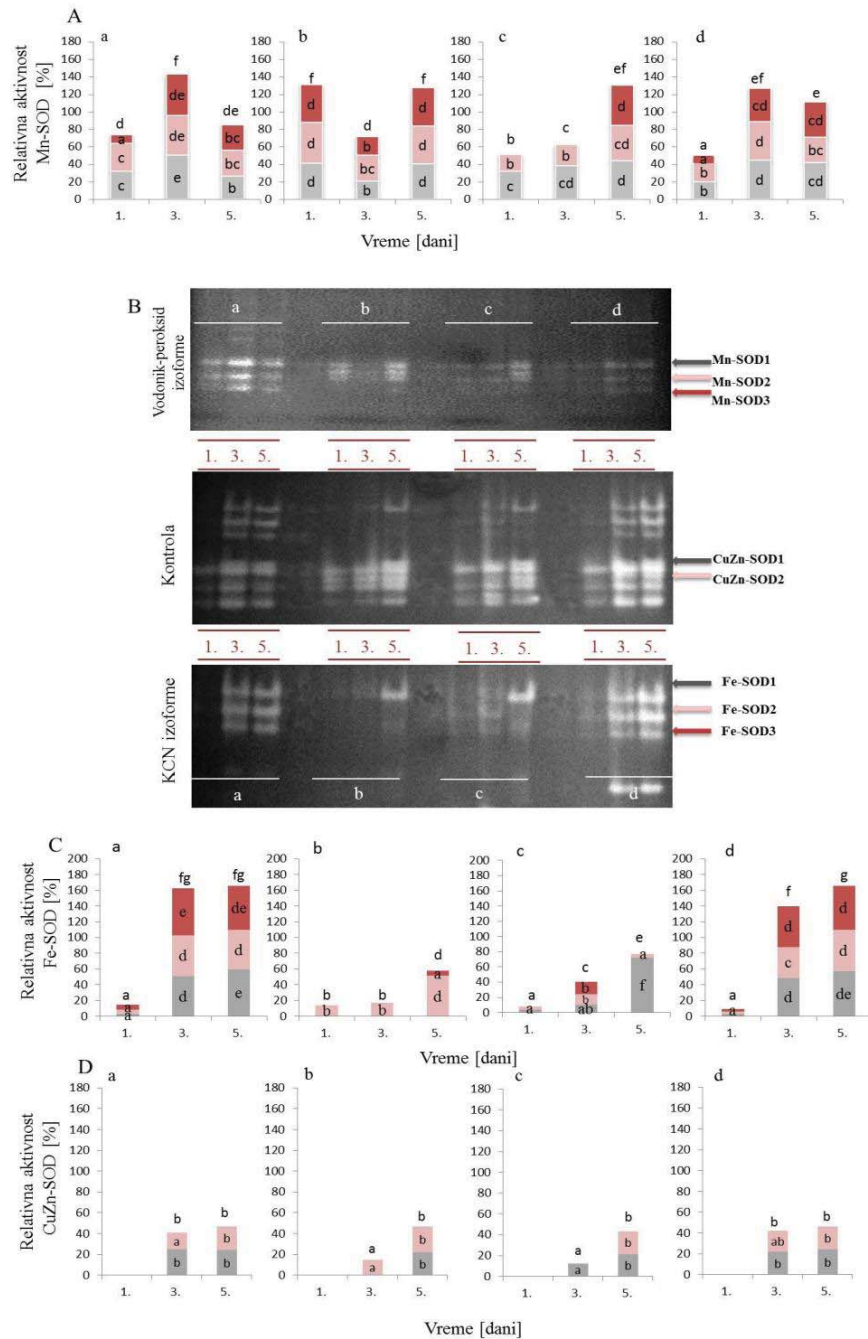
Najizraženiji efekat nepetalaktona na klijanje semena, kao i rastenje i razviće klijanaca kresa, zapažen je pri koncentracijama ovog monoterpena u opsegu od 15 do 20 ppbV, pa su u daljim eksperimentima klijanci *L. sativum* gajeni na navedenim efektivnim koncentracijama nepetalaktona. Kao kontrolna grupa biljaka, korišćeni su klijanci ko-kultivisani sa *N. nervosa*.

#### 4.6.1. Analiza antioksidativnih enzima *Lepidium sativum*

Ispitivano je da li prisustvo visokih koncentracija nepetalaktona u atmosferi dovodi do oksidativnog stresa kod klijanaca kresa koji su tokom pet dana rasli u ko-kulturi sa *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*. Praćen je efekat *cis,trans*- i *trans,cis*-nepetalaktona, s ciljem da se utvrdi da li stereochemija ovog monoterpna utiče na njegov alelopatski potencijal. Promene u enzimskoj komponenti antioksidativnog sistema kresa ispitane su praćenjem aktivnosti i ekspresije enzima superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), peroksidaza (POD) i polifenol oksidaza (PPO).

##### 4.6.1.1. Elektroforetska i spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti superoksid dismutaza (SOD) i imunoblot analiza

U uslovima abiotičkog ili biotičkog stresa, SOD predstavljaju prvu liniju odbrane ćelija od reaktivnih oblika kiseonika (*ROS*). Aktivnost i zastupljenost ove grupe enzima analizirana je tokom rasteanja klijanaca, do petog dana od formiranja ko-kulture sa vrstama roda *Nepeta*. SOD aktivnost analizirana je *in gel* metodom. Ukupni solubilni proteini iz ekstrakta testiranih biljaka razdvojeni su nativnom elektroforezom (Slika **31 B**), a identifikacija pojedinih izoformi SOD izvršena je na osnovu njihove različite osetljivosti na dejstvo inhibitora KCN i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Slika **30 A-D**).

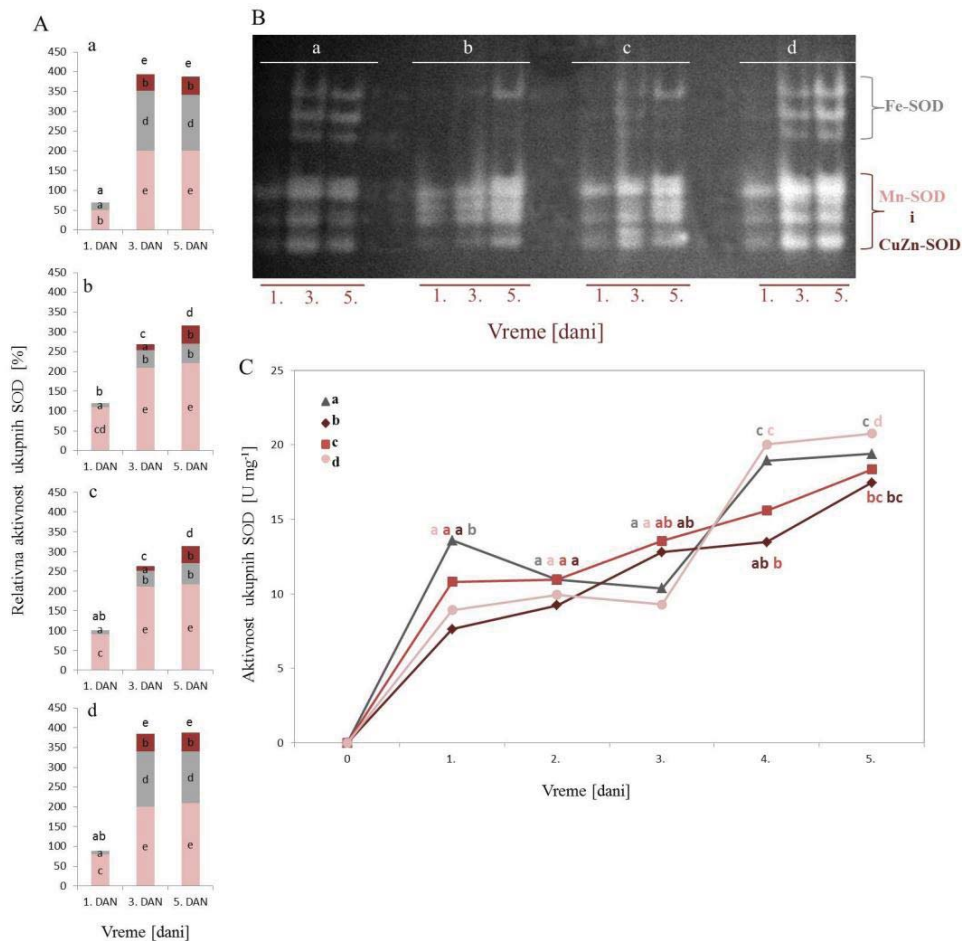


Slika 30. Relativna aktivnost SOD kod klijanaca kresa tokom 5 dana gajenja u ko-kulturi *in vitro*: a) kontrolna grupa klijanaca i klijanci ko-kultivisani sa b) *N. rtanjensis*, c) *N. sibirica* i d) *N. nervosa*. (B), a identifikacija izoforme je izvršena na osnovu njihove različite osetljivosti na dejstvo inhibitora, 3 mM KCN i 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Relativna aktivnost pojedinih izoforme Mn-SOD (A), Fe-SOD (C) i CuZn-SOD (D) određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) prema Fisher's LSD testu.

*In gel* enzimskim testom detektovane su tri izoforme Mn-SOD (Mn-SOD1, Mn-SOD2 i Mn-SOD3) kod klijanaca koji su *in vitro* ko-kultivisani sa tri vrste roda *Nepeta* i kod kontrolnih klijanaca. Sve tri izoforme Mn-SOD kod klijanaca kresa u ko-kulturi sa *N. nervosa*, *N. rtanjensis* i kod kontrolnih klijanaca se javljaju prvog dana i primećen je porast njihove relativne aktivnosti do petog dana (Slika **30 Aa Ab Ad**). Aktivnost Mn-SOD3 izoforme kod klijanaca kresa gajenih u ko-kulturi sa *N. sibirica* se može detektovati tek petog dana (Slika **30 Ac**). Najslabija aktivnost Mn-SOD prvog i trećeg dana je zabeležena kod klijanaca gajenih u atmosferi *cis,trans*-nepetalaktona, koji je karakterističan za vrstu *N. sibirica*.

*In gel* enzimskim testom detektovane su tri izoforme Fe-SOD (Fe-SOD1, Fe-SOD2 i Fe-SOD3) kod klijanaca kresa koji su klijali i rasli u ko-kulturi *in vitro* sa *N. nervosa* i kod kontrolnih klijanaca (Slika **30 Ca Cd**). Sve tri izoforme Fe-SOD se kod pomenutih eksperimentalnih grupa klijanaca javljaju prvog dana i njihova relativna aktivnost statistički značajno raste tokom vremena. Kod klijanaca kresa koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis* detektovane su dve izoforme (Fe-SOD2 i Fe-SOD3), takođe su dve izoforme Fe-SOD detektovane u ko-kulturi sa *N. sibirica* (Fe-SOD1 i Fe-SOD2) (Slika **30 Cb Cc**). U ko-kulturi sa *N. sibirica* trećeg dana je primećena aktivnost i FeSOD3, koja petog dana nije detektovana. Izoforma Fe-SOD2 se kod klijanaca kresa u ko-kulturi sa *N. rtanjensis* može detektovati prvog dana, dok je Fe-SOD3 izoforma zapažena tek petog dana. Generalno, aktivnost ovih enzima raste sa vremenom. Najslabija aktivnost je zabeležena kod klijanaca gajenih u atmosferi *trans,cis*- i *cis,trans*-nepetalaktona.

Kod kontrolne grupe klijanaca i kod klijanaca koji su ko-kultivisani sa tri vrste roda *Nepeta*, *in gel* enzimskim testom detektovane su dve izoforme CuZn-SOD (CuZn-SOD1 i CuZn-SOD2) (Slika **30 D**). Obe CuZn-SOD izoforme su kod klijanaca koji su ko-kultivisani sa *N. nervosa* i kod kontrolnih klijanaca detektovane trećeg dana (Slika **30 Da Dd**). Kod klijanaca koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis* i *N. sibirica* izoforma CuZn-SOD2 se javlja trećeg dana, dok je CuZn-SOD1 izoforma detektovana petog dana (Slika **30 Db Dc**). Primećen je neznatan porast aktivnosti CuZn-SOD izoformi sa vremenom.



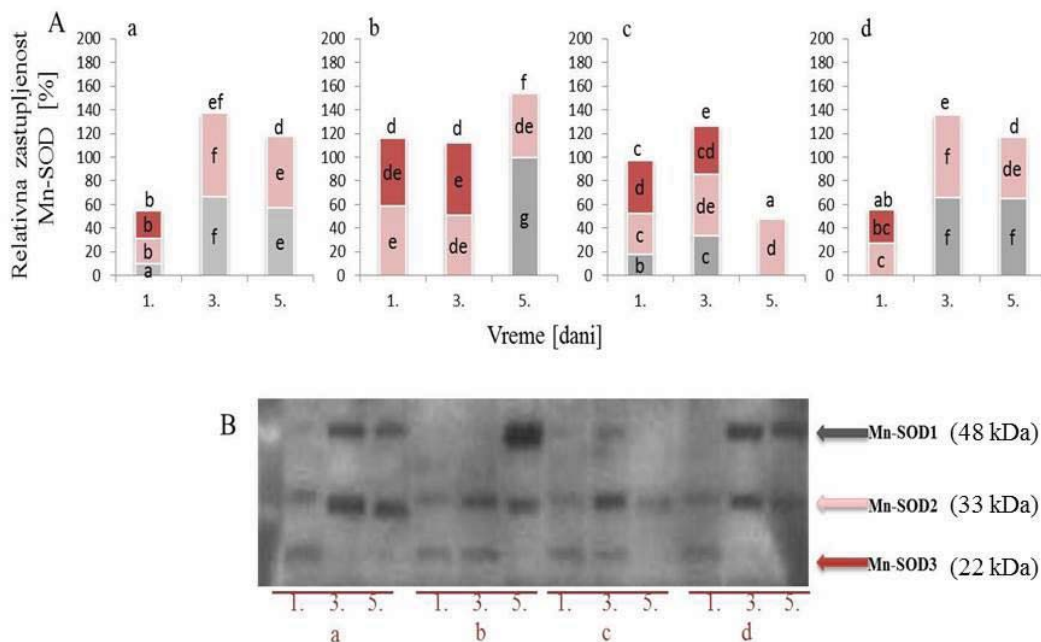
**Slika 31.** A) Relativna aktivnost ukupnih SOD kod klijanaca kresa starih jedan, tri i pet dana a) kontrolni klijanca; klijanca koji su klijali i rasli u ko-kulturi sa b) *N. rtanjensis*; c) *N. sibirica*; d) *N. nervosa*. B) Nativna elektroforeza solubilnih proteina klijanaca kresa. C) Ukupna aktivnost SOD određena spektrofotometrijski, na talasnoj dužini 540 nm.

Rezultati spektrofotometrijske kvantifikacije aktivnosti ukupnih SOD u klijanacima kresa (Slika 31 C) koji su ko-kultivisani *in vitro* sa tri različite vrste roda *Nepeta* pokazali su veću enzimsku aktivnost kod klijanaca kresa koji su rasli u ko-kulturi bez nepetalaktona u poređenju sa ukupnom aktivnošću SOD kod klijanaca koji su rasli u atmosferi sa *trans,cis*- odnosno *cis,trans*-nepetalaktonom.

Generalno, ukupna aktivnost SOD raste od prvog do petog dana na svim tretmanima, pri čemu je najveći porast primećen prvog dana, što odgovara periodu probijanja radikule kod klijanaca iz kontrolne grupe.

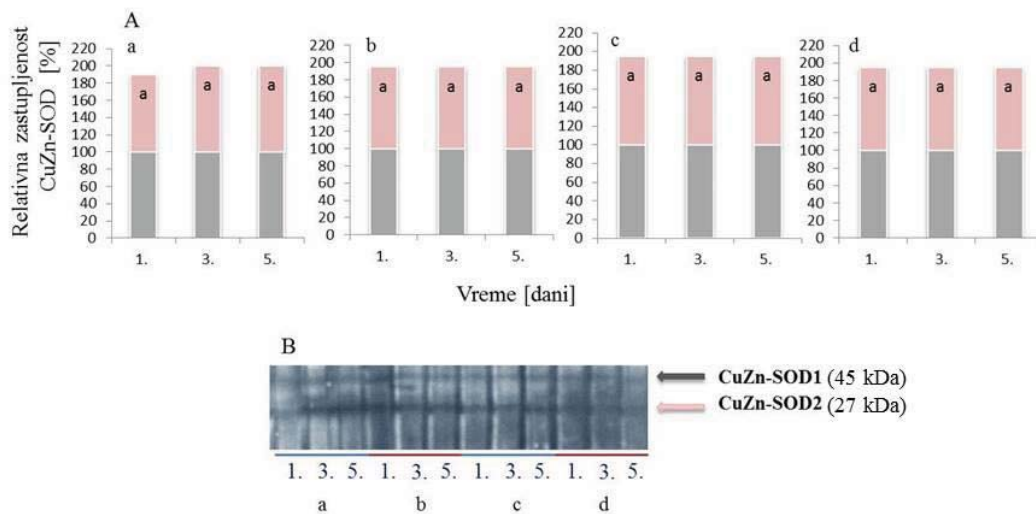
Broj i relativna zastupljenost pojedinih Mn-SOD izoformi utvrđena je imunoblot analizom (Slika **32 A i B**). Kod klijanaca kresa su identifikovane tri Mn-SOD izoforme, relativne molekulske težine 48 kDa, 33 kDa i 22 kDa. Rezultati imunodetekcije jasno ukazuju na to da se zastupljenost sve tri izoforme enzima značajno menja tokom procesa klijanja. Relativna količina Mn-SOD1 izoforme raste tokom vremena. Kod kontrolnih klijanaca i klijanaca ko-kultivisanih sa *N. nervosa*, ova izoforma se javlja trećeg i petog dana (Slika **32 Ba Bd**). Pojava MnSOD1 izoforme je odložena kod klijanaca gajenih u atmosferi *trans,cis*- (do petog dana) i *cis-trans*-nepetalaktona (do trećeg dana) (Slika **32 Bb Bc**). Mn-SOD2 izoforma enzima je prisutna u klijanacima kresa od prvog dana i njena relativna količina raste tokom vremena. Maksimalna zastupljenost ove izoforme uočena je kod klijanaca starih 3 dana, i to u kontrolnoj grupi klijanaca, kao i kod klijanaca gajenih u ko-kulturi sa *N. sibirica* i *N. nervosa*. Kod klijanaca ko-kultivisanih sa *N. rtanjensis* relativna količina Mn-SOD2 izoforme raste tokom vremena i dostiže maksimum petog dana. Rezultati ukazuju na to da *trans,cis*-nepetalakton usporava porast ekspresije ove izoforme SOD tokom rasta klijanaca. Uočava se da relativna količina Mn-SOD3 izoforme opada tokom vremena. Ova izoforma detektovana je kod kontrolnih klijanaca i klijanaca ko-kultivisanih sa *N. nervosa* samo prvog dana, dok se kod klijanaca gajenih u prisustvu oba izomera nepetalaktona javlja prvog i trećeg dana. Rezultati ukazuju da oba izomera nepetalaktona odlažu pojačanu ekspresiju Mn-SOD1 i usporavaju opadanje ekspresije Mn-SOD3 tokom rasta klijanaca. *Trans,cis*-nepetalakton, koji je karakterističan za vrstu *N. rtanjensis*, odlaže pojačanu ekspresiju Mn-SOD2 izoforme.





**Slika 32.** Imuno-detekcija Mn-SOD kod klijanaca kresa: A) Relativna zastupljenost Mn-SOD izoformi kod (a) kontrolnih klijanaca, kao i klijanaca ko-kultivisanih sa (b) *N. rianjensis*, (c) *N. sibirica* i (d) *N. nervosa*. Nakon SDS-PAGE solubilnih proteina i njihovog prebacivanja na nitrocelulozne membrane, vizuelizacija Mn-SOD izoformi urađena je korišćenjem *Anti-Rabbit Mn-SOD* primarnih antitela i *Goat Anti-Rabbit IgG-HRP* sekundarnih antitela, metodom pojačane hemiluminiscencije. Vrednosti relativne zastupljenosti enzima određene su densitometrijski i izražene su u odnosu na maksimalnu izmerenu vrednost. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri nezavisna merenja. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) prema Fišerovom LSD testu. Imunoblot analizom ustanovljeno je prisustvo dve CuZn-SOD izoforme koje se javljaju pri svim tretmanima i čija se relativna zastupljenost ne menja tokom vremena. (Slika 33A 33B).

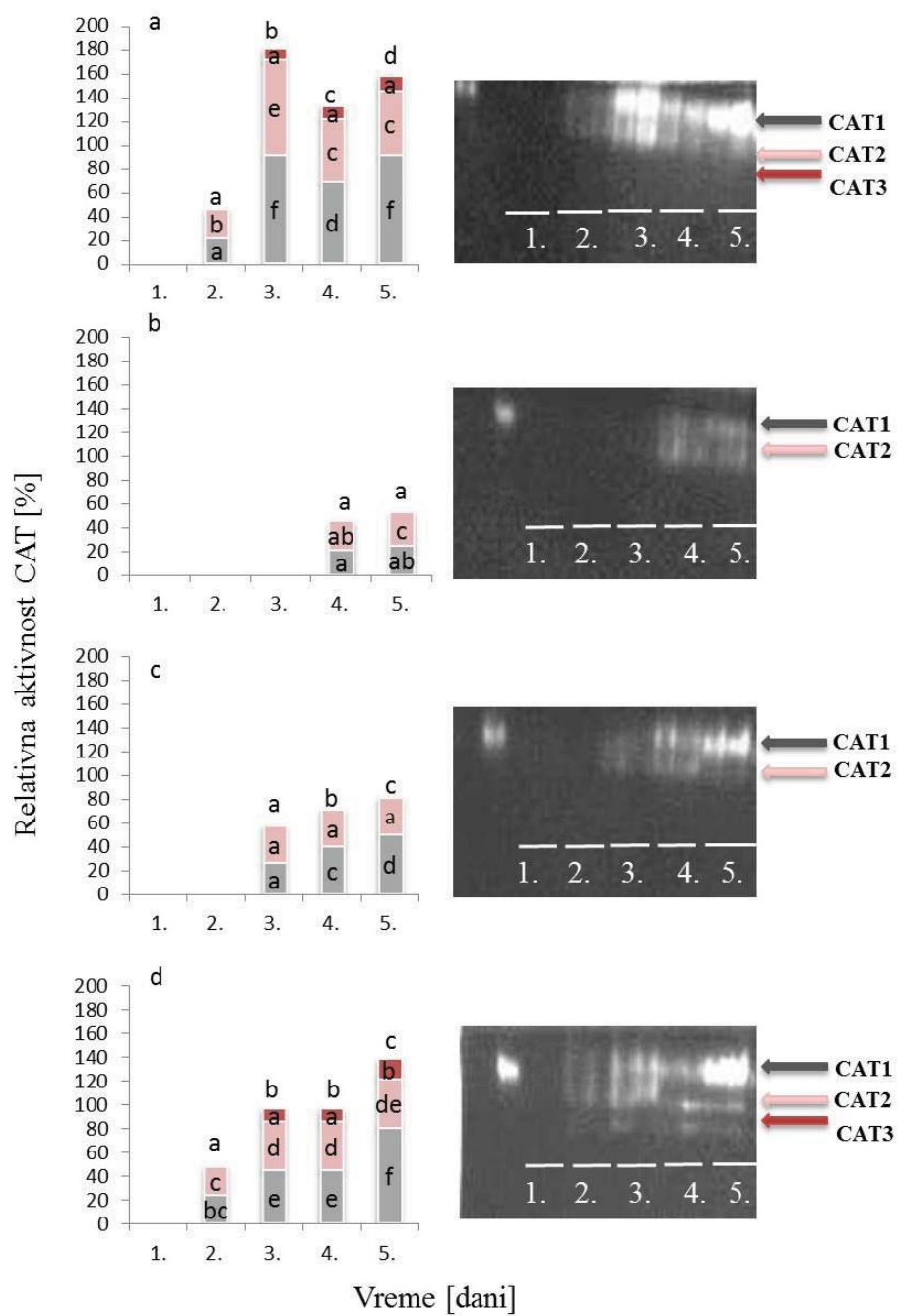
Broj i relativna zastupljenost pojedinih CuZn-SOD izoformi utvrđena je imunoblot analizom. Kod klijanaca kresa su identifikovane dve CuZn-SOD izoforme molekulske težine 45 kDa i 27 kDa (Slika 33). Rezultati imunodetekcije jasno ukazuju na to da se zastupljenost CuZn-SOD1 i CuZn-SOD2 ne menja tokom vremena. Obe izoforme detektovane su i kod kontrolnih klijanaca i kod klijanaca koji su rasli u atmosferi nepetalaktona već prvog dana i njihova zastupljenost se ne menja tokom vremena.



**Slika 33.** A) Relativna zastupljenost CuZn -SOD u klijancima kresa: a) kontrolni klijanci i klijanci ko-kultivisani sa b) *N. rstanjensis*, c) *N. sibirica* i d) *N. nervosa*. B) Nakon SDS-PAGE solubilnih proteina i njihovog prebacivanja na nitrocelulozne membrane, vizuelizacija CuZn-SOD izoformi urađena je korišćenjem *Anti-Rabbit Chloroplastic* CuZn-SOD primarnih antitela i *Goat Anti-Rabbit IgG-HRP* sekundarnih antitela, metodom pojačane hemiluminescencije. Vrednosti relativne zastupljenosti enzima određene su densitometrijski i izražene su u odnosu na maksimalnu izmerenu vrednost. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost tri nezavisna merenja. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) prema Fišerovom LSD testu.

#### 4.6.1.2. Elektroforetska detekcija i spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti katalaza (CAT)

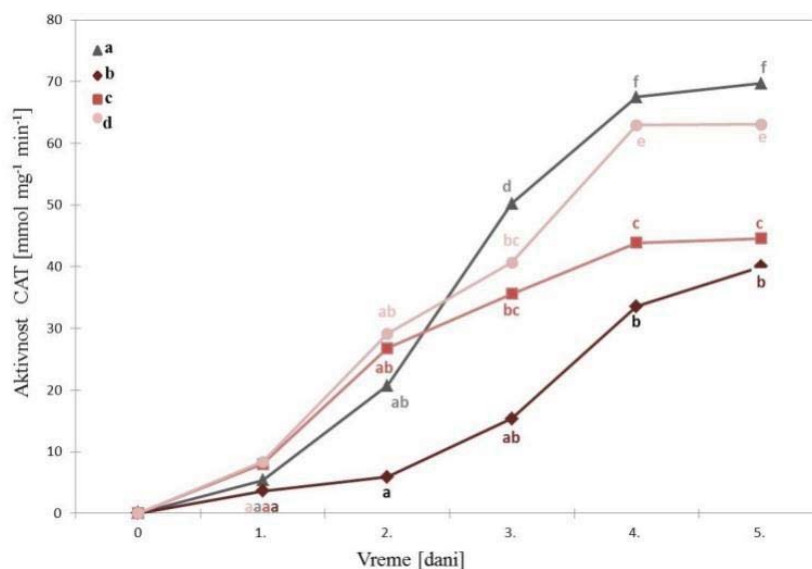
Promena aktivnosti CAT praćena je u klijancima kresa koji su isključivani i rasli u ko-kulturi sa *N. rstanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*. Ukupni solubilni proteini razdvojeni su metodom native elektroforeze, a potom je izvršena *in gel* detekcija katalaznih izoformi (Slika 34).



**Slika 34.** Relativna aktivnost CAT kod klijanaca kresa tokom 5 dana gajenja u uslovima *in vitro*: a) kontrolna grupa klijanaca i klijanci ko-kultivisani sa b) *N. rτανjenensis*, c) *N. sibirica* i d) *N. nervosa*. Relativna aktivnost pojedinih izoformi CAT određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dva merenja. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) prema Fišerovom LSD testu.

*In gel* enzimskim testom detektovane su tri izoforme CAT (CAT1, CAT2 i CAT3) kod klijanaca kresa koji su klijali i rasli u ko-kulturi *in vitro* sa *N. nervosa* i kod kontrolnih klijanaca (Slika **34a 34d**), odnosno dve izoforme (CAT1 i CAT2) kod klijanaca kresa koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis* i *N. sibirica* (Slika **34b 34c**). Sve tri izoforme CAT kod klijanaca kresa u ko-kulturi sa *N. nervosa* i kod kontrolnih klijanaca se javljaju drugog dana i njihova relativna aktivnost statistički značajno raste tokom vremena. Aktivnost CAT1 i CAT2 izoformi se kod klijanca kresa gajenih u ko-kulturi sa *N. rtanjensis* može detektovati tek četvrtog dana, odnosno trećeg dana u ko-kulturi kresa sa *N. sibirica* (Slika **34b**). Aktivnost ovih izoformi raste sa vremenom. Najslabija aktivnost katalaza je zabeležena kod klijanca gajenih u atmosferi *trans,cis*-nepetalaktona, koji je karakterističan za vrstu *N. rtanjensis*. Rezultati pokazuju da oba izomera, a naročito *trans,cis*-nepetalakton, usporavaju porast aktivnosti katalaza tokom rasta klijanaca kresa. Takođe, u prisustvu oba izomera nepetalaktona izostaje aktivnost CAT3 izoforme.

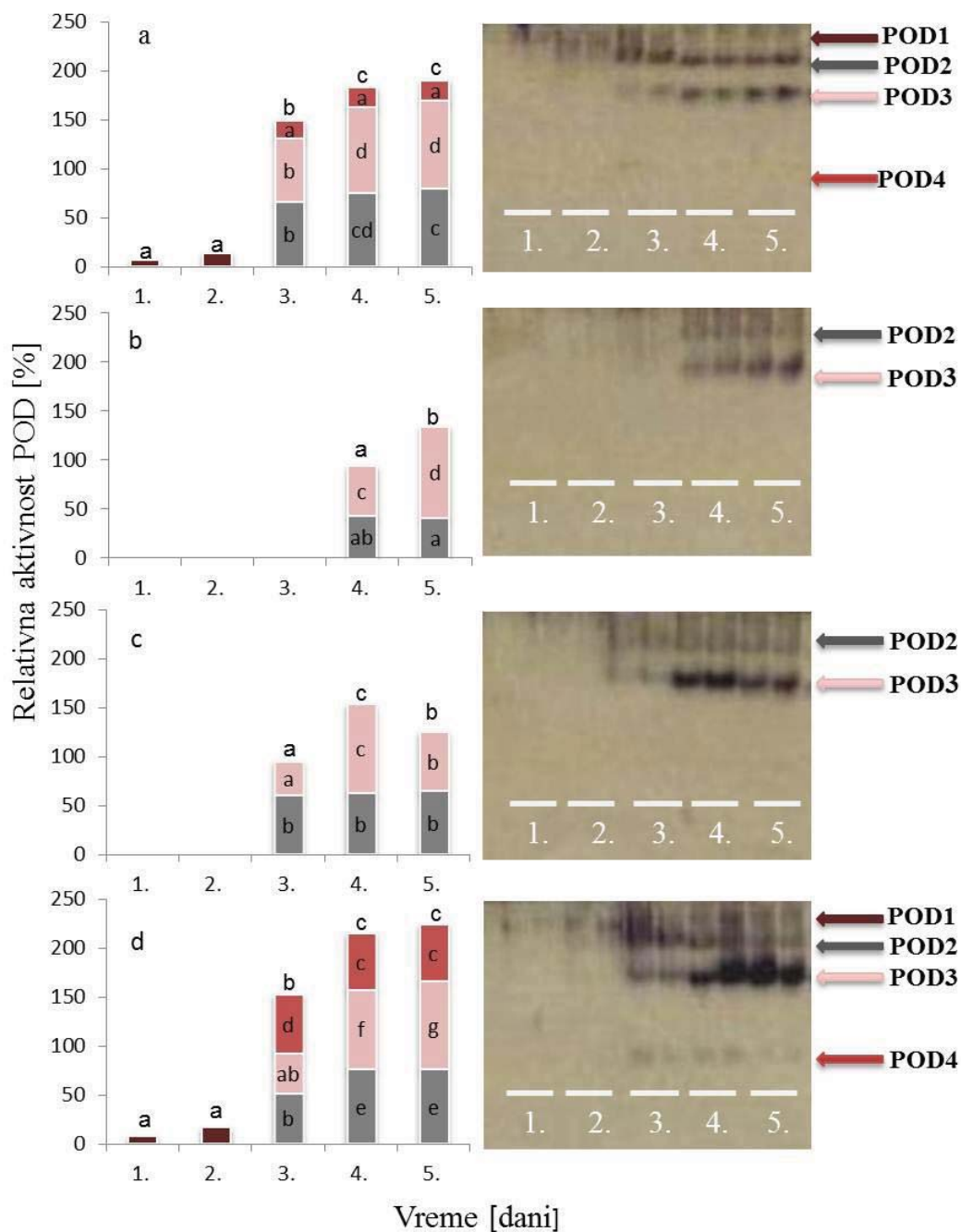
Rezultati spektrofotometrijske kvantifikacije aktivnosti ukupnih CAT u klijanacima kresa pokazuju sličan obrazac. Aktivnost CAT statistički značajno raste tokom rasta klijanaca i dostiže maksimum kod klijanaca starih 5 dana. Najveća aktivnost CAT je detektovana u kontrolnim klijanacima, a najmanja u klijanacima kresa koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis* (Slika **35**).



**Slika 35.** Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti CAT kod klijanaca kresa starih od 1 do 5 dana: a) kontrolni klijanci; klijanci gajeni u ko-kulturi *in vitro* sa b) *N. rtanjensis*, c) *N. sibirica* i d) *N. nervosa*. Aktivnost je određena na talasnoj dužini 240 nm uz korišćenje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao supstrata. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dva nezavisna eksperimenta. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) prema Fišerovom LSD testu.

#### 4.6.1.3. Elektroforetska i spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti peroksidaza (POD)

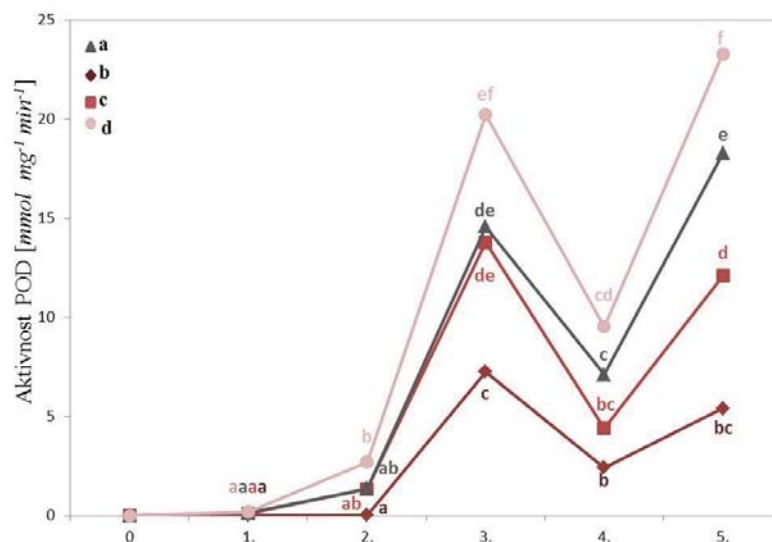
Promene aktivnosti POD ispitivali smo u klijancima kresa od prvog do petog dana rasta u ko-kulturi *in vitro* sa *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*. Specifična POD aktivnost određena je *in gel* testom (Slika 36) i spektrofotometrijskom metodom, a kao supstrat je korišćen pirogalol (Slika 37).



**Slika 36.** Ukupna relativna aktivnost POD u klijancima kresa starim od 1 do 5 dana: a) kontrolni klijanci; klijanci gajeni u ko-kulturi *in vitro* sa b) *N. rtanjensis*, c) *N. sibirica* i d) *N. nervosa*. Relativna aktivnost pojedinih izoformi POD određena je densitometrijski. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) prema Fišerovom LSD testu.

*In gel* enzimskim testom su detektovane četiri izoforme POD kod klijanaca kresa koji su klijali i rasli u ko-kulturi *in vitro* sa *N. nervosa* i kod kontrolnih klijanaca (POD1, POD2, POD3 i POD4) (Slika **36a 36d**), odnosno dve izoforme (POD2 i POD3) kod klijanaca kresa koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis* i *N. sibirica* (Slika **36b 36d**). Aktivnost POD1 izoforme uočava se kod kontrolne grupe klijanaca kresa i kao i kod klijanaca koji su rasli u ko-kulturi sa *N. nervosa* počev od prvog dana. Aktivnost ove izoforme opada tokom vremena. Kod istih eksperimentalnih grupa klijanaca, kao i kod klijanaca raslih u ko-kulturi sa *N. sibirica* POD2 izoforma se pojavljuje 3. dana i njena aktivnost neznatno raste tokom vremena. POD2 izoforma se kod klijanaca ko-kultivisanih sa *N. rtanjensis* javlja tek 4. dana i nije uočena statistički značajna promena aktivnosti petog dana. Aktivnost POD3 izoforme je zabeležena kod klijanaca starih 3 dana, i njena aktivnost značajno raste tokom vremena, pri čemu maksimum aktivnosti dostiže petog dana. Izuzetak su klijanci ko-kultivisani sa *N. rtanjensis*, kod kojih je pojava aktivnosti POD3 odložena za jedan dan. I kod ove eksperimentalne grupe klijanaca značajno raste aktivnost POD3 izoforme tokom vremena, a maksimalna aktivnost se dostiže petog dana. POD4 izoforma je karakteristična za klijance gajene u odsustvu nepetalaktona, i kod ove dve eksperimentalne grupe aktivnost POD4 je uočena kod klijanaca starih 3 dana, nakon čega aktivnost blago opada. Ukupna aktivnost peroksidaza raste tokom vremena i postiže najviše vrednosti kod klijanaca gajenih u odsustvu nepetalaktona. Tretman klijanaca *trans,cis*-nepetalaktonom dovodi do odlaganja aktivnosti peroksidaza za jedan dan.

Rezultati spektrofotometrijske kvantifikacije aktivnosti ukupnih POD u klijancima kresa su pokazali da aktivnost POD od drugog do petog dana statistički značajno raste, s tim što četvrtog dana dolazi do smanjenja aktivnosti u klijancima na svim tretmanima, nakon čega aktivnost ponovo raste. Najveća aktivnost je detektovana u klijancima koji su ko-kultivisani sa *N. nervosa*, dok je najmanja aktivnost POD detektovana u klijancima kresa koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis* (Slika **37**).



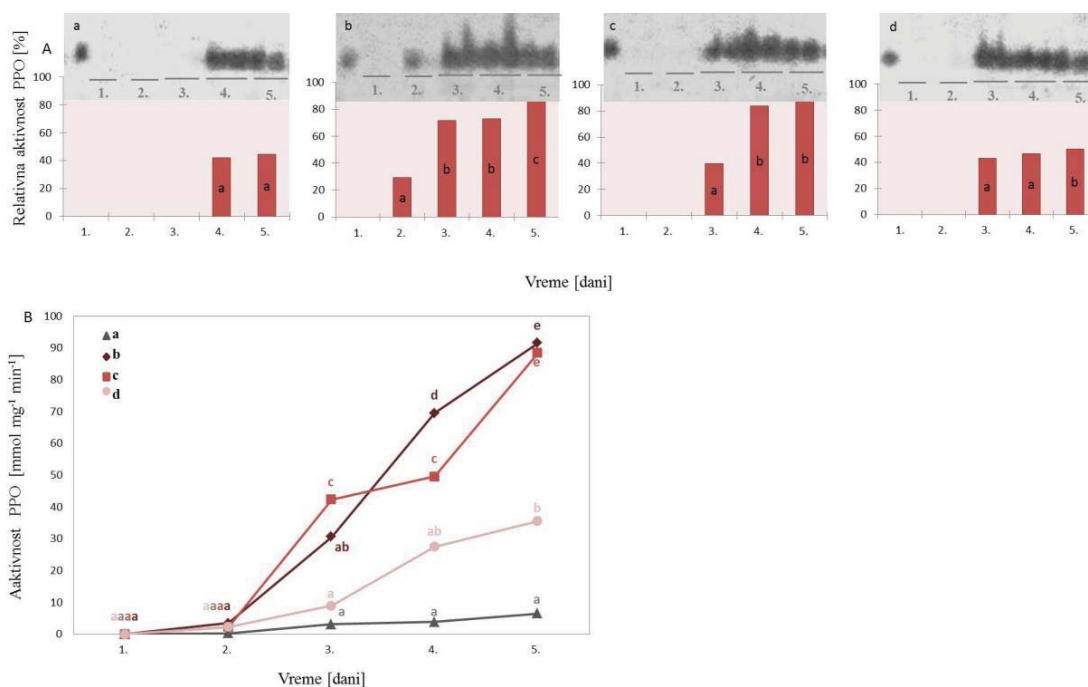
**Slika 37.** Ukupna aktivnost POD u klijancima kresa: a) kontrolni klijanci; klijanci koji su klijali i rasli u ko-kulturi *in vitro* sa b) *N. ratanjensis*, c) *N. sibirica* i d) *N. nervosa*. Aktivnost je određena spektrofotometrijski na talasnoj dužini 430 nm uz korišćenje pirogalola kao supstrata. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) prema Fišerovom LSD testu.

#### 4.6.1.4. Polifenol oksidaze (PPO): elektroforetska detekcija, spektrofotometrijska aktivnost i imunoblot analiza

Pored POD i PPO mogu da oksiduju fenole i da na taj način učestvuju u regulaciji koncentracije fenolnih jedinjenja u biljkama. Praćena je promena aktivnosti PPO u klijancima kresa tokom 5 dana rasta, na svim opisanim tretmanima. *In gel* enzimskim testom detektovana je jedna PPO izoforma (Slika 38A). U kontrolnim klijancima kresa aktivnost PPO je detektovana od četvrtog dana (Slika 38 Aa). Kod klijanaca kresa koji su ko-kultivisani sa *N. sibirica* i *N. nervosa* PPO aktivnost je zabeležena od trećeg dana (Slika 38 Ac Ad). U ko-kulturi klijanaca kresa sa *N. ratanjensis* PPO aktivnost se uočava već od drugog dana (Slika 38 Ab). Relativna aktivnost PPO na svim tretmanima raste tokom vremena, a maksimalana vrednost je uočena kod klijanca gajenih u ko-kulturi sa *N. ratanjensis*, starih 5 dana. Može se zaključiti da *trans,cis*-nepetalakton stimuliše aktivnost PPO, tako što dovodi do ranije aktivacije enzima.



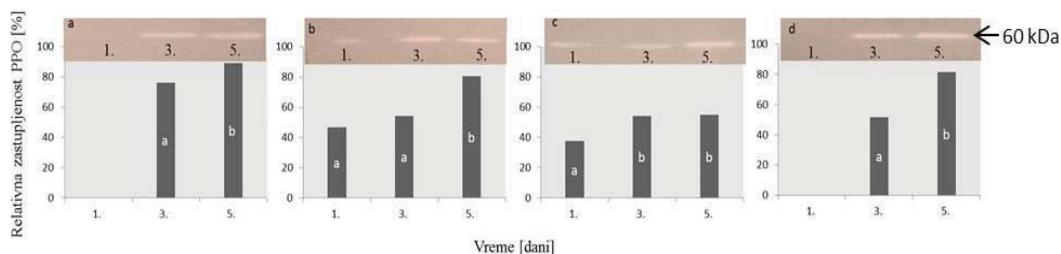
Rezultati spektrofotometrijske kvantifikacije aktivnosti ukupnih PPO u klijancima kresa su pokazali da aktivnost PPO od trenutka kada se pojave statistički značajno raste. Najveća aktivnost je detektovana u klijancima koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis*, dok je najmanja aktivnost PPO detektovana u kontrolnim klijancima (Slika 38 B), što je potvrdilo rezultate dobijene *in gel* analizom aktivnosti ovog enzima.



**Slika 38. Analiza aktivnosti PPO** u klijancima kresa tokom 5 dana rastenja u kulturi *in vitro*: a) kontrolni klijanci; klijanci koji su klijali i rasli u ko-kulturi sa b) *N. rtanjensis*, c) *N. sibirica* i d) *N. nervosa*. Aktivnost PPO određena je A) *in gel* metodom, korišćenjem pirokatehola kao supstrata, uz densitometrijsku kvantifikaciju; i B) spektrofotometrijski, na talasnoj dužini 410 nm uz korišćenje pirokatehola kao supstrata. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dva nezavisna merenja. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) prema Fišerovom LSD testu.

Broj i relativna zastupljenost pojedinih izoformi PPO urađena je pomoću imunoblot analize. U klijancima kresa, bez obzira na tretman, identifikovana je jedna izoforma PPO, relativne molekulske težine 60 kDa. Rezultati imunodetekcije jasno ukazuju da zastupljenost PPO raste tokom procesa klijanja u svim ko-kulturama (Slika 39), kao i da je prvog dana u klijancima koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis* i *N. sibirica* PPO prisutna, ali nije aktivna (Slika 39b 39c). Rezultati pokazuju da oba izomera nepetalaktona utiču na aktivnost PPO tako što indukuju ekspresiju PPO dan ranije u

odnosu na kontrolu, dok se aktivnost enzima javlja dva dana (u slučaju *trans,cis*-nepetalaktona) ili dan ranije (u slučaju *cis,trans*-nepetalaktona) u poređenju sa kljancima gajenim u odsustvu nepetalaktona (Slika 39a 39d). Pored toga, najveća aktivnost PPO detektovana je kod klijanaca gajenih u atmosferi *trans,cis*-nepetalaktona koji je karakterističan za *N. rtanjensis*, a zatim i *cis,trans*-nepetalaktona, koji je dominantan izomer nepetalaktona kod *N. sibirica*.



**Slika 39.** Relativna zastupljenost PPO u kljancima kresa tokom 5 dana gajenja *in vitro*: a) kontrolni kljanci; kljanci koji su ko-kultivisani sa b) *N. rtanjensis*, c) *N. sibirica* i d) *N. nervosa*. Nakon *SDS-PAGE* solubilnih proteina i njihovog prebacivanja na nitrocelulozne membrane, vizuelizacija PPO urađena je korišćenjem poliklonalnih *Mouse Anti-Fungi PPO* primarnih antitela i *Goat Anti-Mouse IgG-HPR* sekundarnih antitela, metodom pojačane hemiluminescencije. Vrednosti relativne zastupljenosti enzima određene su densitometrijski i izražene su u odnosu na maksimalnu izmerenu vrednost. Rezultati predstavljaju srednju vrednost dva nezavisna merenja. Vrednosti označene istim slovom ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima klijanaca *L. sativum*

Količina ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima *L. sativum* od prvog do petog dana rasta u ko-kulturi sa tri vrste *Nepeta* određena je spektrofotometrijskom metodom korišćenjem *Folin-Ciocalteu* reagensa (Tabela 10). Rezultati pokazuju da kod kontrolnih klijanaca količina fenolnih jedinjenja od prvog do petog dana neznatno raste, što je takođe primećeno i kod klijanaca kresa koji su rasli u ko-kulturi sa *N. nervosa*. Kod klijanaca kresa koji su rasli u ko-kulturi sa *N. rtanjensis* primećena je statistički značajno veća količina fenolnih jedinjenja od prvog dana, koja opada sa vremenom. Primećeno je da količina fenolnih jedinjenja kod klijanaca kresa koji su rasli u ko-kulturi sa *N. sibirica* od prvog do trećeg dana raste, a nakon toga četvrtog i petog dana, dolazi do opadnja količine fenolnih jedinjenja u kljancima.

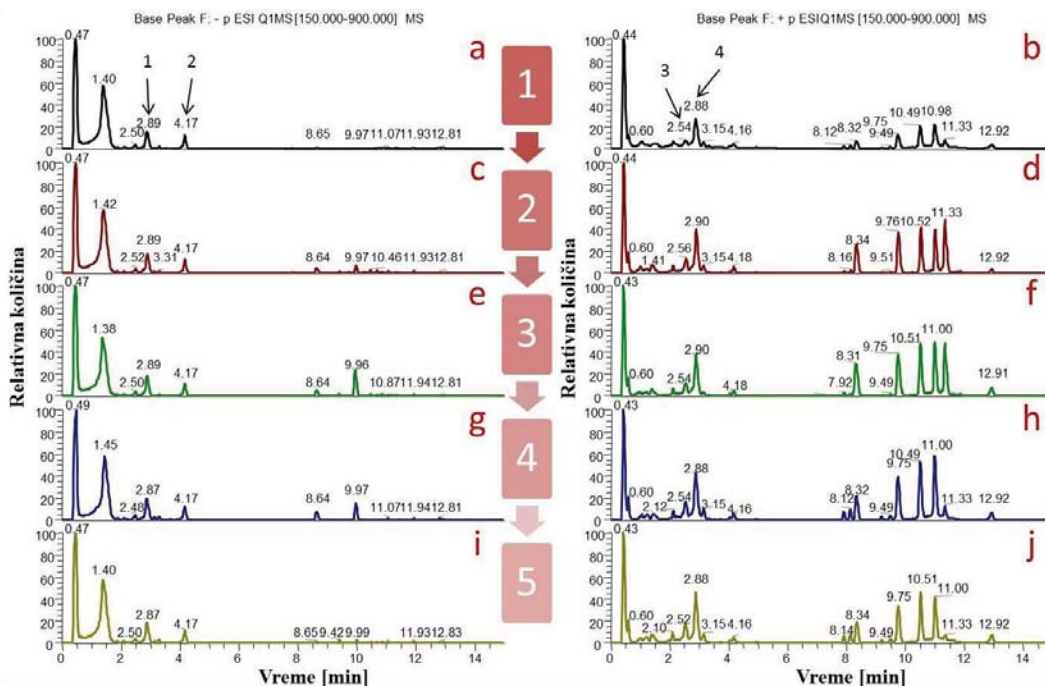
**Tabela 10.** Ukupni fenoli u klijancima kresa tokom 5 dana rasteња u ko-kulturi *in vitro* sa vrstama iz roda *Nepeta*. Količina ukupnih fenolnih jedinjenja određena je spektrofotometrijskom metodom, korišćenjem *Folin-Ciocalteu* reagensa. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) prema Fišerovom *LSD* testu.

Ukupni fenoli <i>L. sativum</i> [mmol EGA g <sup>-1</sup> sveže mase]					
	1.DAN	2.DAN	3.DAN	4.DAN	5.DAN
<b>Kontrola</b>	1,00 <sup>a</sup>	1,11 <sup>a</sup>	1,21 <sup>a</sup>	1,21 <sup>a</sup>	1,26 <sup>a</sup>
<b>Ko-kultura sa <i>N. rtanjensis</i></b>	1,88 <sup>c</sup>	1,41 <sup>ab</sup>	1,39 <sup>ab</sup>	1,38 <sup>ab</sup>	1,18 <sup>a</sup>
<b>Ko-kultura sa <i>N. sibirica</i></b>	1,16 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>	1,32 <sup>a</sup>	1,14 <sup>a</sup>	1,25 <sup>a</sup>
<b>Ko-kultura sa <i>N. nervosa</i></b>	1,15 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>	1,35 <sup>a</sup>	1,47 <sup>a</sup>	1,58 <sup>a</sup>

#### 4.6.2.1. UHPLC-DAD/HESI-MS/MS karakterizacija metanolnih ekstrakata

##### *Lepidium sativum*

*FS UHPLC/HESI-MS* spektri su dobijeni kako u pozitivnom, tako i u negativnom modalitetu, pri čemu spektralni podaci pokazuju seriju pikova u opsegu  $m/z$  od 100 do 900. Prilikom analize metanolnog ekstrakta *Lepidium sativum UHPLC/-HESI-MS* hromatogram ukupnih jona pokazuje jasno razdvojene pikove na  $R_t$  2,89 minuta i 4,17 minuta (Slika **40a**), koji su identifikovani kao: (1)- sinapoil-glukoza ( $m/z$   $[M-H]^-$  je 385), i (2)- sinapoil-malat ( $m/z$   $[M-H]^-$  je 339). Identifikacija je potvrđena u *FS*, *PIS*, *SRM* i *NLS* eksperimentima. *UHPLC/+HESI-MS* hromatogram ukupnih jona pokazuje jasno razdvojene pikove na  $R_t$  2,56 minuta i 2,90 minuta (Slika **40b**), koji su identifikovani kao (3)- sinapaldehid ( $m/z$   $[M+H]^+$  je 209) i (4)- sinapoil-holin (sinapin) ( $m/z$   $[M+H]^+$  je 310).



**Slika 40.** UHPLC/-HESI-MS (a) i UHPLC/+HESI-MS (b) hromatogrami metanolnih ekstrakta klijanaca *L. sativum* starih 1 dan (a i b), 2 dana (c i d), 3 dana (e i f), 4 dana (g i h) i 5 dana (i i j). U metanolnim ekstraktima su identifikovani: (1) sinapoil-glukoza, (2) sinapoil-malat, (3) sinapaldehid i (4) sinapoil-holin (sinapin).

Derivati sinapinske kiseline su identifikovani upoređivanjem *DAD*, *MS* i *MS/MS* spektara sa literaturnim podacima i korišćenjem standarda sinapične kiseline, kao referentnog jedinjenja. Retenciona vremena i  $\lambda_{\max}$  identifikovanih jedinjenja su prikazana u Tabeli 11.

**Tabela 11.** UHPLC/-HESI-MS/MS i UHPLC/+HESI-MS/MS karakterizacija komponenti metanolnih ekstrakata *Lepidium sativum* korišćenjem različitih tipova skeniranja u masenoj spektrofotometriji, uz energiju kolizione ćelije od 30 eV.

Identifikacija	-HESI-MS/MS eksperimenti					DAD podaci	
	Rt (min)	FS [M-H] <sup>-</sup> [m/z]	PIS	MS <sup>2</sup> fragmenti (m/z (relativna zastupljenost %))	NLS	Rt (min)	λ <sub>max</sub> (nm)
<i>cis</i> -sinapoiil glukoza <sup>1</sup>	2,89	385	385	257 (5), 232 (5), 223 (<5), <b>205</b> (35), 191 (<5), <b>190</b> (100), 175 (40), 164 (10)	162	2,77	240, 330
<i>trans</i> -sinapoiil glukoza	3,03	385	385	257 (5), 232 (5), 223 (<5), <b>205</b> (35), 191 (<5), <b>190</b> (100), 175 (40), 164 (10)	162	2,95	240, 330
Sinapoiil malat <sup>1</sup>	4,18	339	339	<b>223</b> (15), 207 (5), 193 (10), <b>164</b> (100)		4,10	240, 330
	+HESI-MS/MS eksperimenti					DAD podaci	
	Rt (min)	FS [M+H] <sup>+</sup> [m/z]	PIS	MS <sup>2</sup> fragmenti (m/z (relativna zastupljenost %))	NLS	Rt (min)	λ <sub>max</sub> (nm)
Sinapaldehid <sup>1</sup>	2,59	209	209	209 (<5), 203 (<5), 164 (<5), 150 (20), <b>149</b> (5), 107 (10), <b>106</b> (100), 105 (85)		2,51	230, 330
<i>cis</i> - sinapin (sinapoiil holin) <sup>1</sup>	2,90	310	310	251 (100), 236 (8), 235 (15), <b>207</b> (55), 206 (10), 191 (8), 179 (10), <b>175</b> (100), 164 (10), 163 (15), 162 (8)		2,85	240, 330
<i>trans</i> - sinapin (sinapoiil holin) <sup>1</sup>	3,16	310	310	251 (100), 236 (8), 235 (15), <b>207</b> (55), 206 (10), 191 (8), 179 (10), <b>175</b> (100), 164 (10), 163 (15), 162 (8)		3,08	240, 320
Sinapična kiselina <sup>5</sup>	3,85	225	225	207 (20), 192 (10), 174 (8), 164 (6), <b>149</b> (30), 147 (12), 132 (12), 119 (15), <b>118</b> (25), 101 (12), 91 (100), 89 (10)		3,77	240, 320

<sup>a</sup>Brojevi pikova, prema Slici 1

<sup>s</sup>Potvrđeno standardima

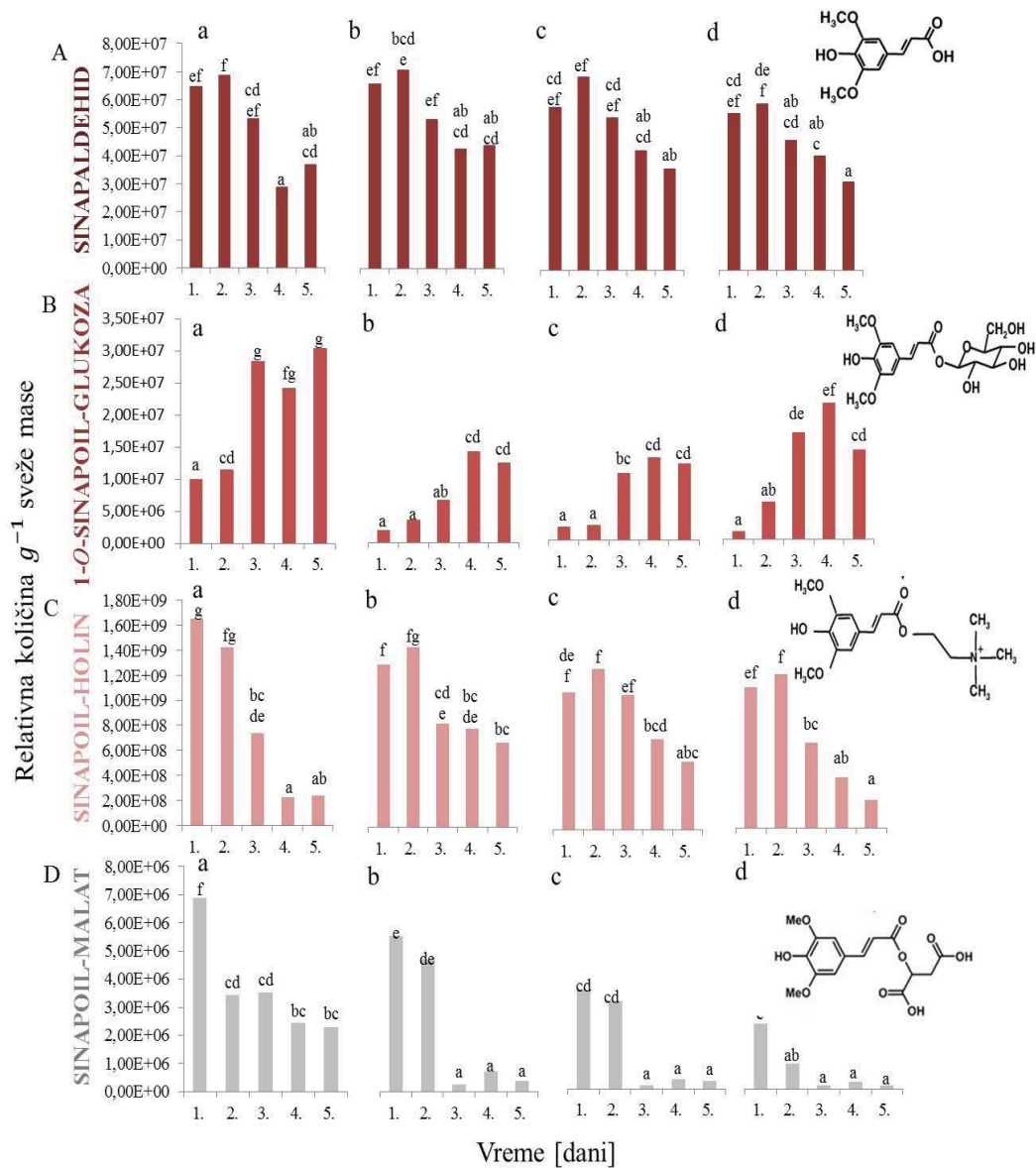
<sup>1</sup>Potvrđeno na osnovu literaturnih podataka

Podebljanim slovima su obeleženi MS<sup>2</sup> fragmenti koji su korišćeni u SRM eksperimentu

Relativna količina dominantnih fenilpropanoidnih jedinjenja koja se akumuliraju u semenima kresa i hidrolizuju za vreme klijanja prikazana je na Slici 41 A-D. Primećen je isti trend opadanja količine sinapaldehida sa vremenom i kod kontrolnih klijanaca kresa i kod klijanaca koji su rasli u ko-kulturi sa *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, stim što je od drugog do petog dana količina sinapaldehida veća kod klijanaca koji su rasli u ko-kulturi sa *N. rtanjensis* i *N. sibirica* nego kod kontrolnih klijanaca i klijanaca ko-kultivisanih sa *N. nervosa* (Slika 41A).

Od prvog do petog dana kod svih klijanaca, kako kontrolnih, tako i ko-kultivisanih dolazi do povećanja količine sinapoil-glukoze (Slika **41B**), s tim što se znatno manja količina sinapoil-glukoze stvara kod klijanaca koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis* i *N. sibirica*.

Na Slici **41C** primećuje se isti trend opadanja količine sinapoil-holina tokom vremena kod kontrolnih klijanaca kresa i kod klijanaca ko-kultivisanih sa tri vrste *Nepeta*. Primećuje se da se trećeg, četvrtog i petog dana stvara veća količina sinapoil-holina kod klijanaca kresa koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis* i *N. sibirica*. Pored toga, količina sinapoil-malata opada sa vremenom kod svih klijanaca kresa (Slika **41D**). U poređenju sa kontrolnim kljancima, količina sinapoil-malata kod klijanaca kresa koji su ko-kultivisani sa *N. rtanjensis* i *N. sibirica* je od trećeg do petog dana značajno manja, dok kod klijanaca kresa koji su ko-kultivisani sa *N. nervosa* količina sinapoilmalata je od prvog do petog dana značajno manja u poređenju sa kontrolnim kljancima.



**Slika 41.** Relativna količina A) sinapaldehyda B) sinapoil-glukoze C) sinapoil-holina D) sinapoil-malata u klijancima kresa tokom 5 dana gajenja *in vitro*: a) kontrolni klijanci; klijanci koji su ko-kultivisani *in vitro* sa b) *N. rtaensis*, c) *N. sibirica* i d) *N. nervosa*. Vrednosti su normalizovane u odnosu na 1 g sveže mase.

#### 4.6.3. Ispitivanje alelopatskog efekta *trans,cis*-nepetalaktona, *cis,trans*-nepetalaktona, $\alpha$ -pinena i $\beta$ -pinena na klijanje odabranih poljoprivrednih kultura i korovskih vrsta

Rezultati hemijskih analiza su pokazali da osim nepetalaktona, koji su dominantna isparljiva jedinjenja kod *N. rtanjensis* i *N. cataria*, ispitivane vrste poseduju i druga isparljiva jedinjenja, naročito iz grupe monoterpena i seskviterpena. U Tabeli 12 je prikazana procentualna zastupljenost pojedinih isparljivih jedinjenja etarskog ulja *N. rtanjensis* koja je određena GC-MS analizom.

**Tabela 12.** GC-MS analiza etarskog ulja *N. rtanjensis*

Jedinjenje	Zastupljenost [%]	Jedinjenje	Zastupljenost [%]
$\alpha$ -pinen	2,99	$\alpha$ -kopaen	0,86
$\beta$ -pinen	0,40	<i>trans,cis</i> -nepetalakton	<b>72,03</b>
1,8-cineol	0,26	$\delta$ -kadinen	0,15
$\alpha$ -kamfolenal	0,21	$\gamma$ -kadinen	0,59
2-metoksi-para-krezol	1,69	$\alpha$ -kalakoren	0,12
<i>cis,trans</i> -nepetalakton	16,31	$\alpha$ -kadinol	0,13

Može se pretpostaviti da sva prisutna isparljiva jedinjenja u određenoj meri mogu doprineti alelopatskom efektu ispitivanih vrsta. S ciljem da se dalje raščlani pojedinačni efekat *cis,trans*-nepetalaktona, *trans,cis*-nepetalaktona,  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena, ispitan je efekat etarskog ulja *N. rtanjensis* koje sadrži 73 % *trans,cis*-nepetalaktona, etarskog ulja *N. cataria* koje sadrži 90 % *cis,trans*-nepetalaktona kao i standarda monoterpena  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinena na klijanje nekoliko poljoprivrednih kultura (*Lactuca sativa* L. sorta „Majska kraljica“, *Lotus corniculatus* L. sorta „Bokor“ (žuti zvezdan), *Brassica napus* L. (uljana repica)), i korovskih vrsta (*Stellaria media* (L.) Vill. (mišjakinja), *Rumex crispus* L. (štavelj) i *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ekotip Kolumbija).

U slučaju kontrolne grupe semena *L. sativum* (fam. *Brassicaceae*) (Slika 42 A), pokazano je da se maksimum klijanja dostiže već posle 24 sata. *Cis,trans*- izomer (Slika 42 Aa), a naročito *trans,cis*- izomer nepetalaktona (Slika 42 Ab) značajno usporavaju dinamiku klijanja.



Na koncentracijama *trans,cis*-nepetalaktona višim od 0,53%, semena čak ni posle 5 dana ne dostižu maksimum klijanja. Na najvišoj primenjenoj koncentraciji ovog izomera prokljalo je samo 35% semena. Kada su semena iskljavana u atmosferi *cis,trans*-nepetalaktona primećeno je usporeno klijanje semena u odnosu na kontrolnu grupu, pa su petog dana samo dve najviše koncentracije pokazale značajan efekat na klijanje semena; pri čemu je takođe zabeležen visok procenat klijanja od 90% i 87,5% na koncentracijama *cis,trans*-nepetalaktona od 2,15% i 4,30%.  $\alpha$ -pinen (Slika **42 Ac**) i  $\beta$ -pinen (Slika **42 Ad**) blago usporavaju dinamiku klijanja semena kresa, ali već drugog dana, na svim ispitivanim koncentracijama, semena su kljerala do nivoa kontrole. (Slika A). Statistička analiza je predstavljena u Tabelama **13** i **14**.

Semena *Lactuca sativa* (fam. *Asteraceae*) pokazala su veliku osetljivost na ispitivana jedinjenja u svim primenjenim koncentracijama, a naročito na dva izomera nepetalaktona (Slika **42 B**). Kontrolna grupa semena salate dostiže maksimum klijanja šestog dana (85%). Tretmani *trans,cis*- i *cis,trans*-nepetalaktonom u koncentracijama višim od 0,52% u slučaju *trans,cis*- izomera (Slika **42 Ba**) i 0,26% u slučaju *cis,trans*-izomera nepetalaktona (Slika **42 Bb**), doveli su do potpune inhibicije klijanja semena salate. Na koncentracijama dva izomera nižim od pomenutih zabeležena je značajno usporena dinamika klijanja, pri čemu je maksimum klijanja na ovim tretmanima postignut šestog dana i iznosio je 12,5%. U poređenju sa kontrolnom grupom,  $\alpha$ -pinen (Slika **42 Bc**) i  $\beta$ -pinen (Slika **42 Bd**) takođe značajno utiču na klijanje semena salate. Sa porastom koncentracije ovih monoterpena dolazi do značajnog usporavanja dinamike klijanja semena, naročito u slučaju  $\alpha$ -pinena gde dve najveće primenjene koncentracije skoro potpuno inhibiraju klijanje semena salate. Statistička analiza je predstavljena u Tabelama **13** i **14**.

Praćen je efekat različitih koncentracija *cis,trans*-nepetalaktona, *trans,cis*-nepetalaktona,  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena na procenat klijanja semena žutog zvezdana (*Lotus corniculatus*, fam. *Fabaceae*), i na dinamiku klijanja semena tokom 9 dana u kulturi *in vitro*, pošto semena žutog zvezdana dostižu punu kljavost tek osmog dana (80%). Dinamika klijanja semena žutog zvezdana na tretmanima sa *cis,trans*-nepetalaktonom (Slika **43 Ab**),  $\alpha$ -pinenom (Slika **43 Ac**) i  $\beta$ -pinenom (Slika **43 Ad**) je imala isti trend kao kod kontrolne grupe semena, bez obzira na koncentraciju primenjenih jedinjenja.

Sve primenjene koncentracije *trans,cis*-nepetalaktona su imale inhibitorni efekat na klijanje semena, značajno usporavajući dinamiku njihovog klijanja (Slika **43 Aa**). Najizraženiji efekat je imala najveća primenjena koncentracija ovog monoterpena (4,3%), pa broj prokljalih semena nakon 9 dana nije prelazio 50%. Statistička analiza rezultata je predstavljena u Tabelama **13** i **14**.

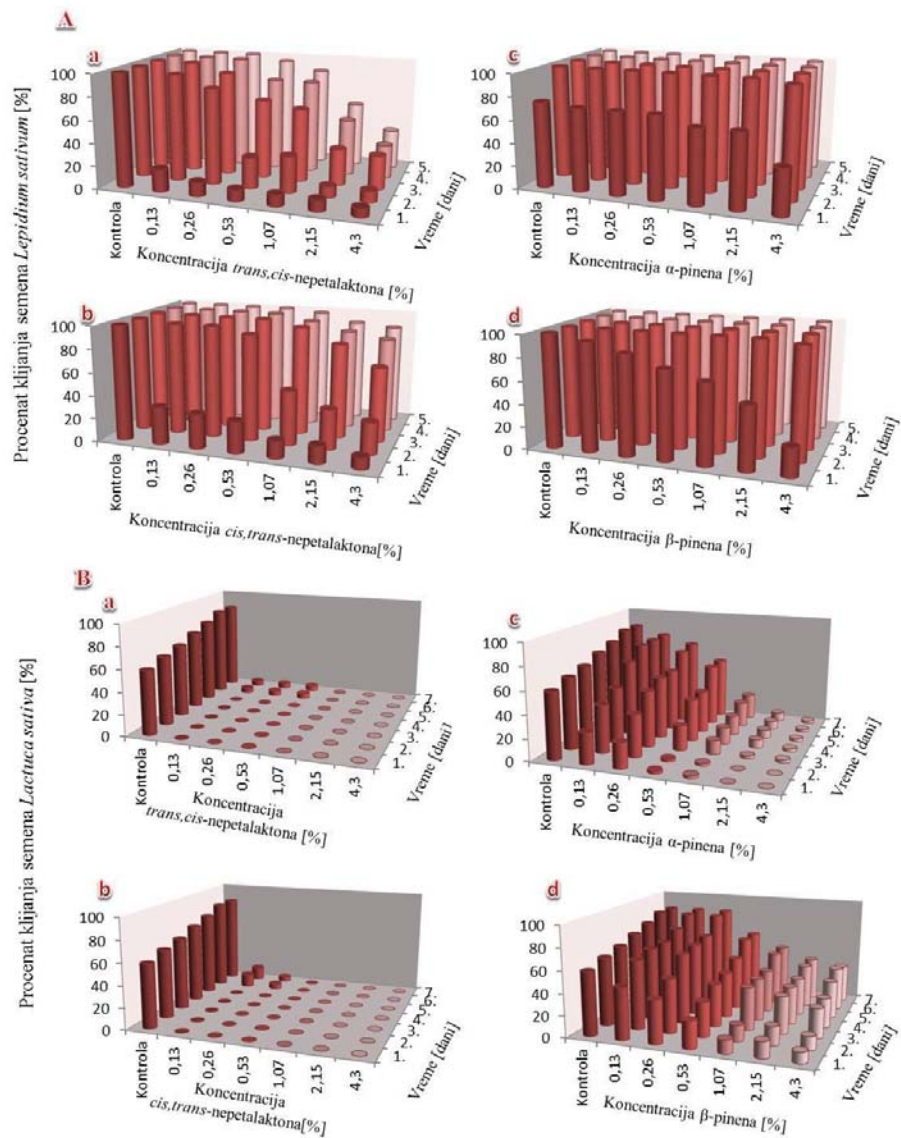
Semena uljane repice (*Brassica napus*, fam *Brassicaceae*) su u eksperimentima pokazala visoku otpornost na alelopatski efekat svih ispitivanih jedinjenja. Značajna inhibicija klijanja semena uljane repice sa porastom koncentracije *cis,trans*-nepetalaktona (Slika **43 Bb**), *trans,cis*-nepetalaktona (Slika **43 Ba**),  $\alpha$ -pinena (Slika **43 Bc**) i  $\beta$ -pinena (Slika **43 Bd**), uočena je samo prvog dana. Kako semena kontrolne grupe dostižu maksimalnu klijavost već drugog dana, a tada nije uočen efekat ispitivanih jedinjenja i njihovih različitih koncentracija na klijanje, može se reći da nije uočeno alelopatsko dejstvo na ovu vrstu semena (Slika **43 B**). Statistička analiza rezultata je predstavljena u Tabelama **13** i **14**.

Uticao ispitivanih jedinjenja na klijanje semena *Rumex crispus* (fam. *Polygonaceae*) praćen je tokom četiri dana u kulturi *in vitro*, s obzirom da semena ove vrste dostižu maksimalnu vrednost klijanja četvrtog dana. *Rumex crispus* je pokazao visok stepen otpornosti na alelopatski efekat ispitivanih jedinjenja, u svim primenjenim koncentracijama (Slika **44 A**). Efekat *trans,cis*-nepetalaktona, *cis,trans*-nepetalaktona,  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena na klijanje semena običnog štavelja ogleda se jedino u blagom usporavanju dinamike klijanja do četvrtog dana, naročito u slučaju *trans,cis*-nepetalaktona (Slika **44 Aa**). Statistička analiza rezultata je predstavljena u Tabelama **13** i **14**.

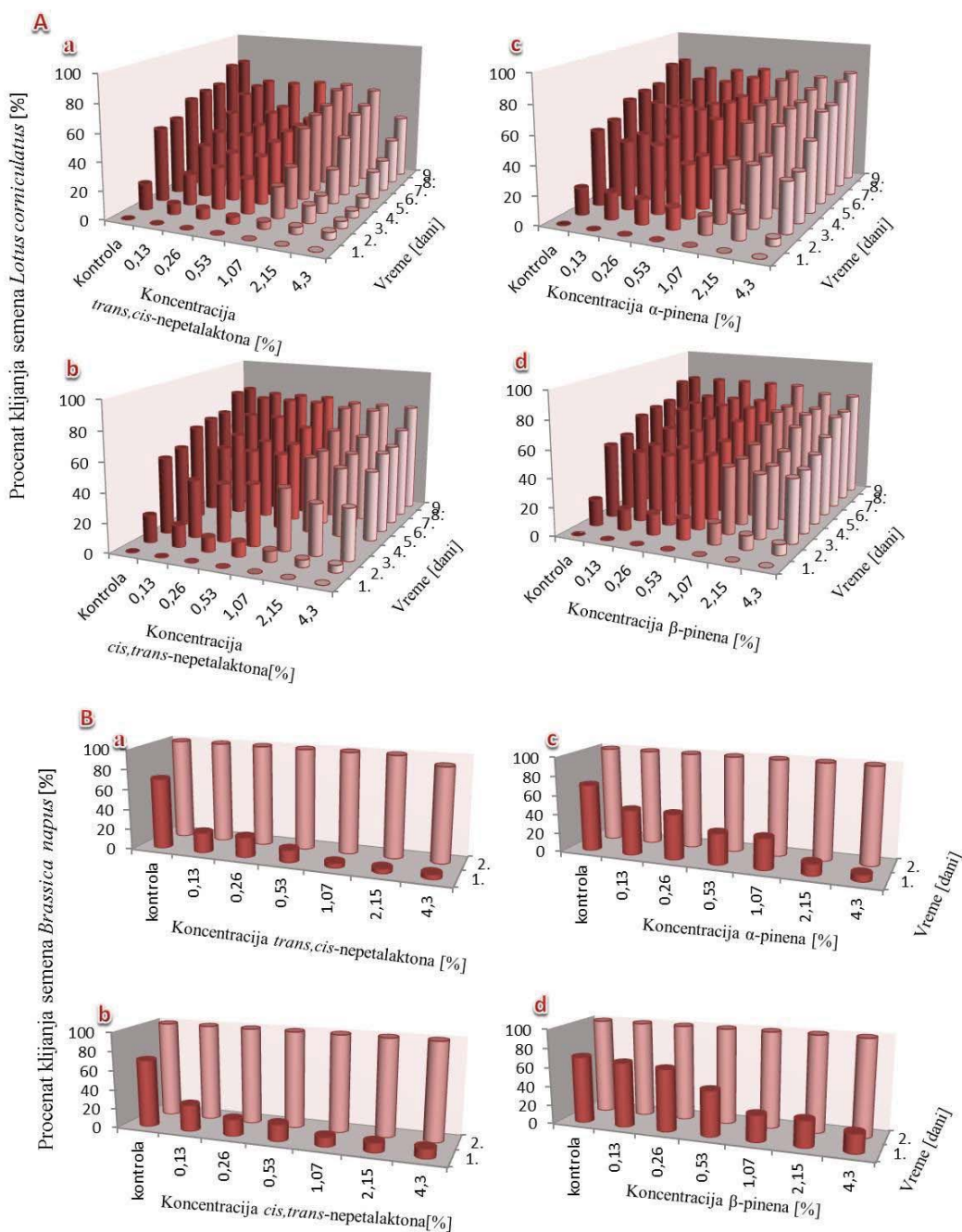
Uočen je visok stepen osetljivosti semena mišjakinje (*Stellaria media*, fam. *Caryophyllaceae*) na alelopatsko dejstvo ispitivanih jedinjenja (Slika **44 B**). Semena *S. media* u našim eksperimentalnim uslovima dostižu maksimum klijanja drugog dana. Sa porastom koncentracije monoterpena koji su korišćeni u eksperimentima, raste inhibitorno dejstvo na klijanje semena, naročito u slučaju *trans,cis*-nepetalaktona (Slika **44 Ba**) i *cis,trans*-nepetalaktona (Slika **44 Bb**).

Najmanja primenjena koncentracija oba izomera nepetalaktona drastično usporava dinamiku klijanja semena mišjakinje, pri čemu se maksimum klijanja dostiže petog dana i iznosi 5% u slučaju *trans,cis*- izomera i oko 33% u slučaju *cis,trans*-izomera nepetalaktona. Koncentracije oba izomera više od 0,13% potpuno inhibiraju klijanje semena ove vrste. Sa porastom koncentracije  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena uočeno je opadanje procenta klijanja semena, kao i značajno usporavanje dinamike klijanja semena mišjakinje. Na svim tretmanima  $\alpha$ -pinenom i  $\beta$ -pinenom maksimalna klijavost uočena je petog dana, i te vrednosti se zadržavaju do osmog dana. Dve najviše primenjene koncentracije  $\alpha$ -pinena (2,15% i 4,3%) u potpunosti inhibiraju klijanje semena *S. media* (Slika **44 Bc**). U slučaju  $\beta$ -pinena (Slika **44 Bd**), najveće alelopatsko dejstvo detektovano je u prisustvu 4,3% ovog monoterpena. Statistička analiza rezultata je predstavljena u Tabelama **13** i **14**.

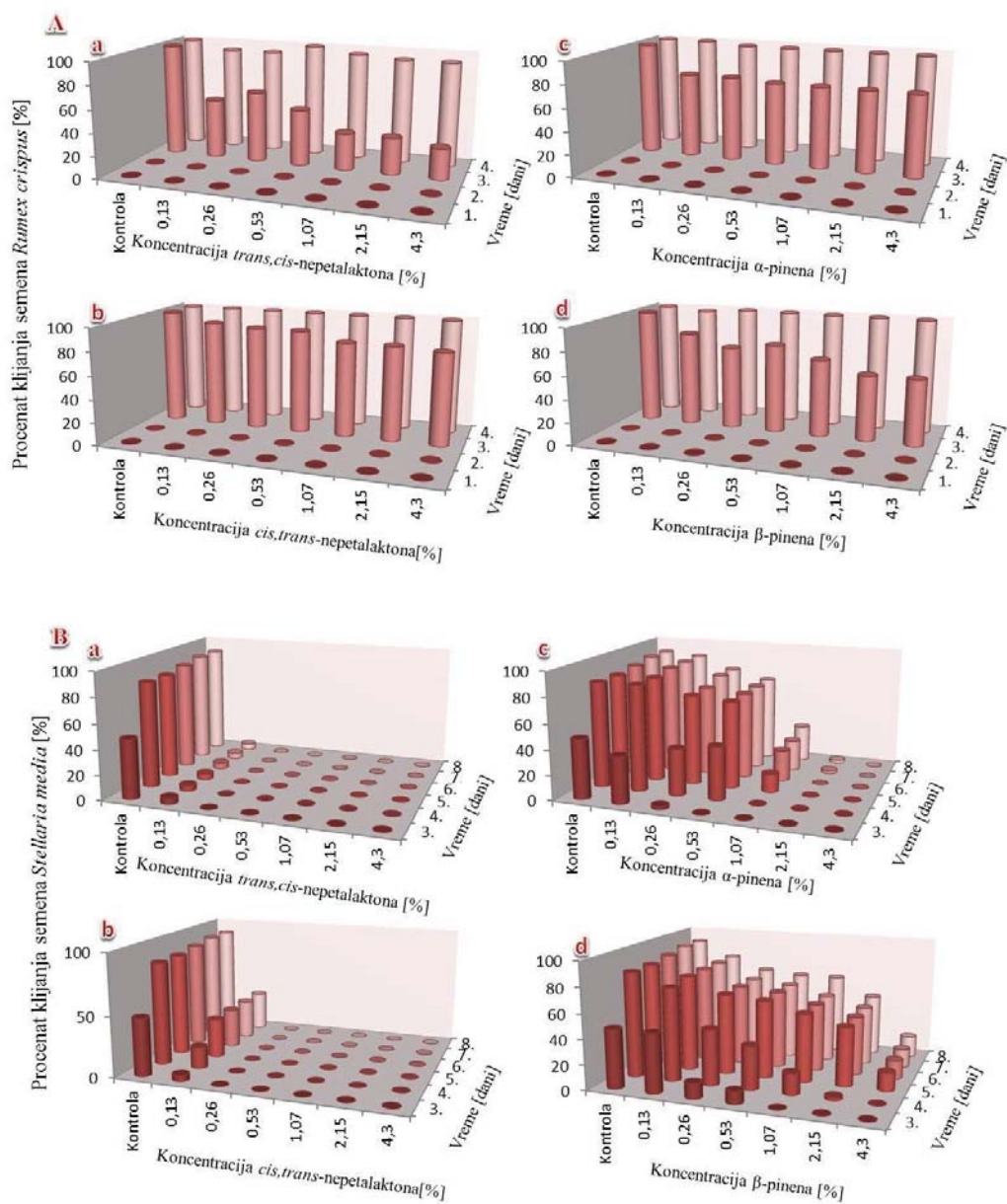
Efekat alelopatskog dejstva etarskog ulja *N. rtanjensis* i *N. cataria*, kao i  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena na klijanje semena *Arabidopsis thaliana* (fam. *Brassicaceae*) praćen je od četvrtog do devetog dana, nakon što su semena stratifikovana na 4°C tokom tri dana u mraku. Odmah po izlaganju uslovima dugog dana, kontrolna semena su klijala 100%, dok su semena na tretmanu sa  $\alpha$ -pinenom (Slika **45 Ac**) i  $\beta$ -pinenom (Slika **45 Ad**) dostigla maksimalnu klijavost sa zakašnjenjem od jednog dana, tj. drugog dana nakon završene stratifikacije. Na osnovu toga se može zaključiti da ova dva monoterpena blago usporavaju dinamiku klijanja semena *A. thaliana* na svim primenjenim koncentracijama. Koncentracije *cis,trans*-nepetalaktona do 1,07% utiču na klijanje semena *A. thaliana* tako što blago usporavaju dinamiku klijanja, a maksimum klijanja se dostiže petog dana, tj. drugog dana nakon stratifikacije (Slika **45 Ab**). Dalji porast koncentracije ovog izomera značajno utiče na dinamiku klijanja semena, kao i generalno na procenat klijanja koji nakon 9 dana iznosi oko 83% na tretmanu sa 2,15% *cis,trans*-nepetalaktona i oko 48% na tretmanu sa 4,3% istog izomera. U ovim slučajevima se maksimalna klijavost dostiže osmog dana. Koncentracije *trans,cis*-nepetalaktona od 4,3% i 2,15%, smanjile su broj proklijalih semena na 48%, tj. 35%, dok su na ostalim koncentracijama semena klijala u istom procentu kao i u kontrolnim uslovima, ali sa smanjenom dinamikom (Slika **45 Aa**). Statistička analiza rezultata je predstavljena u Tabelama **13** i **14**.



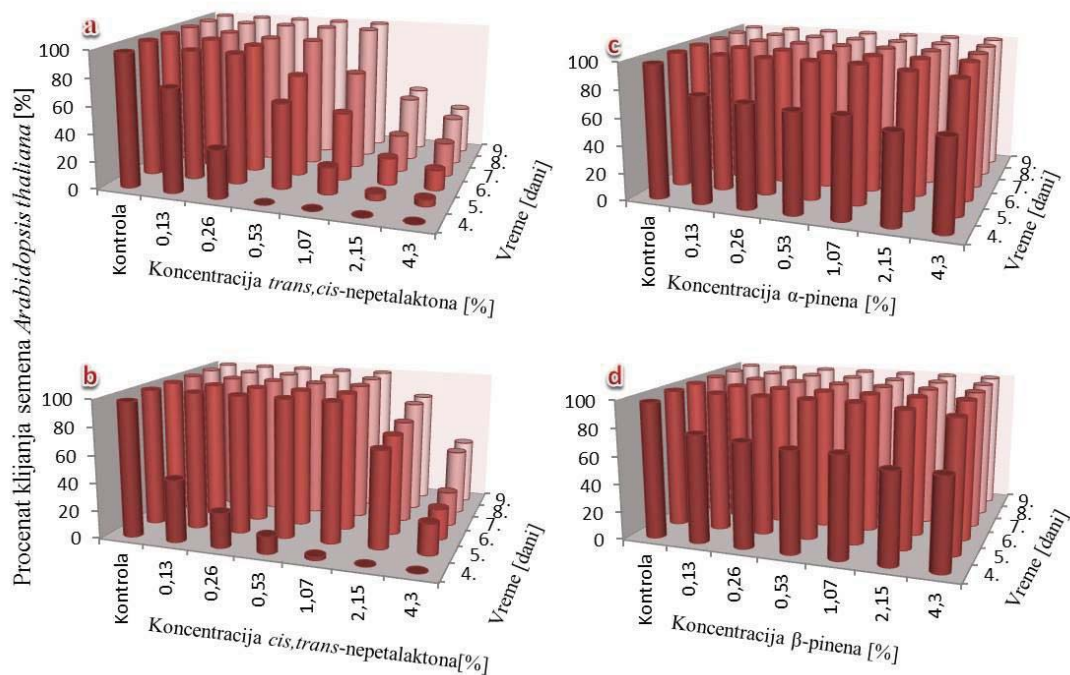
**Slika 42.** Uticaj metanolnog razblaženja etarskog ulja a) *N. rtanjensis* (sadrži 73% *trans,cis*-nepetalaktona); b) etarskog ulja *N. cataria* (sadrži 90% *cis,trans*-nepetalaktona); c) standarda  $\alpha$ -pinena i d)  $\beta$ -pinena, na klijanje semena A) *Lepidium sativum* L. i B) *Lactuca sativa* L. Na histogramima su predstavljene srednje vrednosti dva eksperimenta.



**Slika 43.** Uticaj metanolnog razblaženja etarskog ulja a) *N. rtanjensis* (sadrži 73% *trans,cis*-nepetalaktona); b) etarskog ulja *N. cataria* (sadrži 90% *cis,trans*-nepetalaktona); c) standarda  $\alpha$ -pinena i d)  $\beta$ -pinena, na klijanje semena A) *Lotus corniculatus* L. i B) *Brassica napus* L. Na histogramima su predstavljene srednje vrednosti dva eksperimenta.



**Slika 44.** Uticaj metanolnog razblaženja etarskog ulja a) *N. rnanjensis* (sadrži 73% *trans,cis*-nepetalaktona); b) etarskog ulja *N. cataria* (sadrži 90% *cis,trans*-nepetalaktona); c) standarda  $\alpha$ -pinena i d)  $\beta$ -pinena, na klijanje semena A) *Rumex crispus* L. B) *Stellaria media* (L). Vill. Na histogramima su predstavljene srednje vrednosti dva eksperimenta.



**Slika 45.** Uticaj metanolnog razblaženja etarskog ulja a) *N. rtanjensis* (sadrži 73% *trans,cis*-nepetalaktona); b) etarskog ulja *N. cataria* (sadrži 90% *cis,trans*-nepetalaktona); c) standarda  $\alpha$ -pinena i d)  $\beta$ -pinena, na klijanje semena *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. ekotip Kolumbija. Na histogramima su predstavljene srednje vrednosti dva eksperimenta.

**Tabela 13.** Statistička analiza podataka (% klijanja semena) dobijenih za kontrolnu grupu semena svake ispitivane vrste. Analiza je predstavljena za dane kada su semena dostigla maksimalnu klijavost.

vrsta	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan	6. dan	7. dan	8. dan	9. dan
<i>Lepidium sativum</i>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>							
<i>Lotus corniculatus</i>		19 <sup>a</sup>	52 <sup>b</sup>	55 <sup>b</sup>	65 <sup>c</sup>	68 <sup>c</sup>	69 <sup>c</sup>	80 <sup>d</sup>	80 <sup>d</sup>
<i>Brassica napus napus</i>	24 <sup>a</sup>	98 <sup>b</sup>							
<i>Lactuca sativa</i>	59 <sup>a</sup>	64 <sup>ab</sup>	68 <sup>ab</sup>	74 <sup>bc</sup>	79 <sup>cd</sup>	84 <sup>cd</sup>	85 <sup>d</sup>		
<i>Stellaria media</i>			48 <sup>a</sup>	85 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	88 <sup>b</sup>	90 <sup>b</sup>	90 <sup>b</sup>	
<i>Arabidopsis thaliana</i>				97 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>			
<i>Rumex crispus</i>			65 <sup>a</sup>	92 <sup>b</sup>					

**Tabela 14.** Statistička analiza podataka (% klijanja semena) dobijenih za sve koncentracije *trans,cis*-nepetalaktona, *cis,trans*-nepetalaktona,  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena. Analiza je predstavljena za dane kada je kontrolna grupa semena dostigla maksimalnu klijavost.

	K [%]	<i>Lepidum sativum</i> 1. dan	<i>Lotus corniculatus</i> 8. dan	<i>Brassica napus</i> 2. dan	<i>Lactuca sativa</i> 5. dan	<i>Stelaria media</i> 4. dan	<i>Arabidopsis thaliana</i> 4. dan	<i>Rumex crispus</i> 4. dan
<i>trans,cis</i> -nepetalakton	0	100 <sup>b</sup>	80 <sup>e</sup>	98 <sup>b</sup>	79 <sup>b</sup>	85 <sup>c</sup>	98 <sup>d</sup>	92 <sup>a</sup>
	0,13	20 <sup>a</sup>	65 <sup>d</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	75 <sup>c</sup>	92 <sup>a</sup>
	0,26	12 <sup>a</sup>	50 <sup>bcd</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	35 <sup>b</sup>	92 <sup>a</sup>
	0,53	10 <sup>a</sup>	42 <sup>ab</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	1,07	10 <sup>a</sup>	68 <sup>d</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>
	2,15	10 <sup>a</sup>	58 <sup>cd</sup>	100 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>
4,30	8 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>	
<i>cis,trans</i> -nepetalakton	0	100 <sup>d</sup>	80 <sup>b</sup>	98 <sup>a</sup>	79 <sup>b</sup>	85 <sup>c</sup>	98 <sup>e</sup>	92 <sup>a</sup>
	0,13	32 <sup>c</sup>	78 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup>	45 <sup>d</sup>	100 <sup>b</sup>
	0,26	30 <sup>bc</sup>	78 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	25 <sup>cd</sup>	100 <sup>b</sup>
	0,53	28 <sup>bc</sup>	78 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	12 <sup>bc</sup>	100 <sup>b</sup>
	1,07	15 <sup>ab</sup>	75 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2 <sup>ab</sup>	100 <sup>b</sup>
	2,15	15 <sup>ab</sup>	75 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>
4,30	10 <sup>a</sup>	62 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	
$\alpha$ -pinen	0	100 <sup>c</sup>	80 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	79 <sup>e</sup>	85 <sup>c</sup>	98 <sup>b</sup>	92 <sup>a</sup>
	0,13	72 <sup>ab</sup>	70 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	78 <sup>e</sup>	85 <sup>c</sup>	78 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	0,26	72 <sup>b</sup>	70 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	55 <sup>d</sup>	38 <sup>b</sup>	75 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
	0,53	72 <sup>b</sup>	75 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	38 <sup>c</sup>	42 <sup>b</sup>	72 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
	1,07	65 <sup>ab</sup>	75 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
	2,15	65 <sup>ab</sup>	70 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	8 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
4,30	40 <sup>a</sup>	78 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	
$\beta$ -pinen	0	100 <sup>f</sup>	80 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	79 <sup>c</sup>	85 <sup>d</sup>	98 <sup>b</sup>	98 <sup>a</sup>
	0,13	95 <sup>e</sup>	70 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	75 <sup>bcd</sup>	75 <sup>d</sup>	85 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>
	0,26	88 <sup>de</sup>	70 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	70 <sup>bcd</sup>	45 <sup>c</sup>	80 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>
	0,53	78 <sup>cd</sup>	70 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	50 <sup>ab</sup>	35 <sup>bc</sup>	78 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
	1,07	70 <sup>bcd</sup>	68 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup>	73 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>
	2,15	55 <sup>b</sup>	68 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>
4,30	25 <sup>a</sup>	68 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	



## 5. DISKUSIJA

Sekundarni metaboliti biljaka se zbog mnogobrojnih bioloških i farmakoloških osobina koje pokazuju, često označavaju i kao bioaktivna jedinjenja. Iako se ranije smatralo da su sekundarni metaboliti sporedni produkti metabolizma bez značaja za biljke, danas se zna da oni ostvaruju mnoge fiziološke i ekološke funkcije u samoj biljci. Etarska ulja štite biljku od prevelikog zagrevanja, učestvuju u privlačenju insekata, odbrani od herbivora, itd. Sa stanovišta ekologije veoma je bitna alelopatska i repelentna uloga sekundarnih metabolita koja opravdava njihovu upotrebu kao prirodnih herbicida i insekticida. Flavonoidi, terpenoidi i alkaloidi su najviše korišćene klase sekundarnih metabolita u hemotaksonomskim studijama (*Marin, 2003*). Danas se sekundarni metaboliti upotrebljavaju u industriji hrane kao konzervansi i začini. Produkti sekundarnog metabolizma se koriste u farmaceutskoj industriji kao bioaktivna jedinjenja koja imaju mnogobrojne medicinske efekte (*Wyk i Wink, 2004*). Različiti glikozidi se koriste u lečenju srčane isuficijencije, dok su mnogi alkaloidi našli primenu u industriji lekova. Morfin se koristi za ublažavanje bolova, kodein za ublažavanje kašlja, papaverin predstavlja inhibitor diesteraza, kinin ispoljava antimalarično dejstvo, rezerpin se upotrebljava za lečenje hipertenzije, galantamin je inhibitor acetyl-holin esteraze, dok kapsaicin ublažava reumatske bolove (*Karruppusamy, 2009*).

Opisan je veliki broj bioloških aktivnosti vrsta roda *Nepeta*, uključujući repelentnu aktivnost protiv insekata (komaraca, bubašvaba, crva i krpelja), i ulogu feromona kod mačaka (*Bates i Sigel, 1963, Peterson i Coats, 2001, Peterson i sar., 2002, Chauhan i sar., 2005, Bernier i sar., 2005, Webb i Russel, 2007, Polsomboon i sar., 2008, Spero i sar., 2008, Birkett i sar., 2010*). Vrste ovog roda takođe pokazuju i brojne farmakološke aktivnosti, kao što su: antiviralno, citotoksično, antiinflamatorno, analgetičko i antimitogeno dejstvo (*Harney i sar., 1978, Aydin i sar., 1999, Aydin i sar. 1998, Duke i sar., 2002, Badisa i sar., 2003, Galati i sar., 2004, Miceli i sar., 2005, Rabbami i sar., 2008, Rigano i sar., 2011*). Već duži niz godina se ispituje antimikrobno dejstvo etarskog ulja vrsta roda *Nepeta*.

Pokazan je značajan antibakterijski i antifungalni efekat etarskih ulja vrsta *N. crispera*, *N. rtanjensis*, *N. cataria*, *N. nuda* subsp. *albiflora*, *N. camphorata*, *N. argolica*, *N. juncea*, *N. leavigata*, *N. kurramensis*, *N. septemcrenata* i drugih (Kalpoutzakis i sar., 2001, Sonboli i sar., 2004, Stojanović i sar., 2005, Adiguzel i sar., 2009, Alim i sar., 2009, Hussain i sar., 2009, El-Moaty, 2010, Shinwari i sar., 2013). Pored toga, pokazano je da ekstrakti vrsta *N. flavida*, *N. mayeri*, *N. sibthorpi*, *N. italica*, *N. cilicia*, *N. caesarea* imaju značajan antioksidativni potencijal za razliku od odgovarajućih etarskih ulja, koja pokazuju slabo antioksidativno dejstvo (Yazici i sar., 2001, Miceli i sar., 2005, Tepe i sar., 2007, Cigremis i sar., 2010). Poslednjih godina raste interes za upotrebu prirodnih jedinjenja u kontroli rasta korovskih vrsta. Kobaisy i sar., (2005) i Mancini i sar., (2009) su pokazali alelopatski potencijal etarskih ulja *N. pannonica*, *N. curviflora* i *N. nuda*, dok isparljiva jedinjenja vrste *N. fassennii* inhibiraju klijanje test vrste *L. sativum* (Hyun Eon i sar., 2006). Takođe je pokazano da ekstrakt *N. mayeri* inhibira klijanje i rast klijanaca nekih korovskih vrsta i poljoprivrednih kultura (Mutlu i sar., 2011, Mutlu i Atici, 2009).

Kao objekti istraživanja, u ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su tri endemične vrste roda *Nepeta*, za koje u literaturi postoje oskudni podaci o biološkim aktivnostima koje pokazuju. Poznato je da etarsko ulje *N. rtanjensis* ima snažno antibakterijsko i antifungalno dejstvo, dok za *N. sibirica* i *N. nervosa* u literaturi ne postoje podaci o biološkim aktivnostima. Prema tome, ovom disertacijom je po prvi put ispitana antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*, kao i njihov antioksidativni potencijal. Takođe, ova disertacija po prvi put ukazuje na značajno alelopatsko dejstvo monoterpena, koji su glavne komponente etarskih ulja vrsta *N. rtanjensis* i *N. sibirica*.

S obzirom da se radi o endemičnim i retkim biljnim vrstama, a u slučaju *N. rtanjensis* i o krajnje ugroženoj vrsti, biljni materijal za potrebe eksperimenata je dobijen gajenjem biljaka u uslovima *in vitro*. Uspešna mikropropagacija vrste *N. rtanjensis* je ranije opisana (Mišić i sar, 2005a, Mišić i sar, 2005b), pri čemu su kao eksplantati korišćeni segmenti stabla sa po jednim nodusom i vršni delovi stabala. Isti protokol za mikropropagaciju je primenjen i za vrste *N. sibirica* i *N. nervosa*.

Sve tri ispitivane vrste su pokazale visok stepen regeneracije i multiplikacije u uslovima u kojima su gajene. Generalno, *in vitro* kulture predstavljaju dobar izvor biljnog materijala za potrebe eksperimenata. U literaturi postoje podaci samo za *in vitro* gajenje vrste *N. nuda* ssp. *nuda* koja najveći stepen regeneracije i multiplikacije postiže uz primenu regulatora rastjenja, auksina i citokinina (Nedelkova i sar., 2011).

Pokazano je da u kulturi izdanaka *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* dolazi do produkcije osnovnih grupa sekundarnih metabolita karakterističnih za vrste roda *Nepeta*. Biljke gajene *in vitro* su fitohemijski okarakterisane korišćenjem serije različitih analitičkih metoda kao što su *GC-MS*, *CG-FID*, *PTR-MS*, *Headspace-GC-MS*, *HPLC-DAD*, *HPLC-MS* i *UHPLC/DAD/HESI-MS/MS*. Uspešno su identifikovani i kvantifikovani glavni bioaktivni sekundarni metaboliti u metanolnim i dihlor-metanskim ekstraktima nadzemnih delova biljaka i u atmosferi posuda u kojima su gajene tri vrste roda *Nepeta*. Od isparljivih jedinjenja, kod vrsta *N. rtanjensis* i *N. sibirica*, kao dominantno jedinjenje identifikovan je monoterpen nepetalakton, dok su druga isparljiva jedinjenja iz grupe monoterpena i seskviterpena prisutna u znatno manjoj količini. *Cis,trans*- izomer nepetalaktona je dominantan kod vrste *N. sibirica*, dok je kod *N. rtanjensis* to *trans,cis*-nepetalakton. *GC-MS* i *CG-FID* analize su potvrdile prisustvo ovih jedinjenja u metanolnim i dihlor-metanskim ekstraktima nadzemnih delova. Identifikacija isparljivih jedinjenja u atmosferi posuda za gajenje biljaka urađena je *Headspace-GC-MS* analizom, dok je *PTR-MS* analiza omogućila njihovu kvantifikaciju. *PTR-MS* analiza se pokazala veoma korisnom u našim istraživanjima pošto obezbeđuje *on line* monitoring isparljivih jedinjenja na osnovu njihovih masa, u realnom vremenu. Ova metoda je u našim eksperimentima po prvi put korišćena za identifikaciju i kvantifikaciju isparljivih jedinjenja u biljnim kulturama *in vitro* (Nestorović i sar., 2009a, Nestorović i sar., 2009b, Nestorović i sar., 2010). Vrsta *N. nervosa* se generalno odlikuje niskim sadržajem isparljivih jedinjenja, dok je nepetalakton detektovan samo u tragovima. Činjenica da se tri vrste koje smo odabrali za objekte u eksperimentima odlikuju različitim kvalitativnim sadržajem nepetalaktona, omogućila je ispitivanje i razdvajanje antimikrobnog, antioksidativnog i alelopatkog dejstva različitih stereoisomera nepetalaktona, čime je omogućena potvrda hipoteze da stereohemija nepetalaktona utiče na njegove biološke aktivnosti.

Produkcija i akumulacija sekundarnih metabolita u kulturi *in vitro* ćelija i kalusa uspešno je demonstrirana u slučaju diterpenoida i seskviterpenoida, ali retko u slučaju monoterpenoida (Knoss, 1999). Kulture kalusa *Nepeta cataria*, *Salvia officinalis*, *Mentha spicata* i *M. piperita* i mnogih drugih vrsta fam. *Lamiaceae*, ne proizvode merljive količine monoterpenoida koje su karakteristične za intaktne biljke (Downing i Mitchelli, 1975, Falk i sar., 1990). Izostanak vidljive akumulacije monoterpenoida može biti posledica odsustva biosinteze u nediferenciranim ćelijama kakve su ćelije kalusa, ali i njihove degradacije i uključivanja u kataboličke procese (Falk i sar., 1990). Biosinteza i akumulacija monoterpenoida kod vrsta fam. *Lamiaceae* obično je povezana sa prisustvom sekretornih struktura, epidermalnih žlezdanih trihoma. Usled odsustva žlezdanih struktura kod *in vitro* kultura ćelija i tkiva, verovatno izostaje *de novo* sinteza monoterpenoida. Takođe, moguće je da u kalusnim tkivima dolazi do sinteze terpena, ali u količinama koje nisu detektabilne primenjenim analitičkim metodama. S druge strane, u kulturi *in vitro* izdanaka velikog broja vrsta fam. *Lamiaceae* primećena je biosinteza i akumulacija monoterpenoida: *Salvia officinalis* (Santos-Gomes i Fernandes-Ferreira, 2003), *Rosmarinus officinalis* (Tawfik, 1998), *N. rtanjensis* (Mišić, 2003, Mišić i sar., 2005a, Nestorović i sar., 2010), *N. sibirica*, *N. nervosa* (Nestorović i sar., 2010).

Kod *in vitro* gajenih *N. rtanjensis* i *N. sibirica* skenirajućom elektronskom mikroskopijom ustanovljeno je prisustvo velikog broja kapitatnih i peltatnih žlezdanih trihoma, što je povezano sa detekcijom značajne količine monoterpena nepetalaktona. Kod vrste *N. nervosa*, koja u uslovima *in vitro* produkuje značajno niže količine isparljivih monoterpenoidnih i seskviterpenoidnih jedinjenja, primećen je i srazmerno manji broj žlezdanih struktura. Postoji veoma malo literaturnih podataka o postojanju žlezdanih struktura kod aromatičnih biljnih vrsta porodice *Lamiaceae* u uslovima *in vitro*. Zuzarte i sar. (2010) su skenirajućom elektronskom mikroskopijom kod lavande, gajene u uslovima *in vitro*, detektovali prisustvo velikog broja kapitatnih i peltatnih žlezdanih trihoma. U pogledu produkcije sekundarnih metabolita *in vitro* kultura omogućava selekciju visokoproduktivnih ćelijskih linija, pruža mogućnost modifikacije hranljive podloge u cilju veće produkcije sekundarnih metabolita, omogućava upotrebu abiotičkih i biotičkih elicitora (Jeong i Park, 2007), omogućava različite genetičke transformacije i modifikacije ekspresije gena koji su povezani sa biosintezom željenog

produkta sekundarnog metabolizma (*Sévon i sar., 2002, Bourgaud i sar., 2001*), i omogućava produkciju velike količine sekundarnih metabolita u bioreaktorima (*Bourgaud i sar., 2001*).

Druga grupa sekundarnih metabolita od interesa u našim istraživanjima su fenolna jedinjenja, kojima se pripisuje veliki broj bioloških aktivnosti, uključujući antimikrobno, antioksidativno i alelopatsko dejstvo. *UHPLC/DAD/HESI-MS/MS* analiza je omogućila identifikaciju i kvantifikaciju dominantnih fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima nadzemnih delova biljaka koje su gajene u uslovima *in vitro*. Ruzmarinska kiselina je zabeležena kao glavna fenolna kiselina u metanolnim ekstraktima sve tri ispitivane vrste. Kod vrsta *N. sibirica* i *N. rtanjensis*, kao značajne komponente prisutni su i derivati ruzmarinske kiseline. Ruzmarinska kiselina je takođe detektovana u kulturi *in vitro* izdanaka mnogih vrsta familije *Lamiaceae* kao što su *Origanum vulgare* (*Yang i Shetty, 1998*), *Zataria multiflora* (*Mohagheghzadeh i sar., 2004*) *Salvia officinalis* i *S. fruticosa* (*Kintzios i sar., 1999*), *Mentha longifolia* i *M. piperita* (*Krzyzanowska i sar., 2011*), *Rosmarinus officinalis* (*Kuhlman i Rühl, 2006*), itd. Pored ruzmarinske kiseline, biljke gajene u uslovima *in vitro* mogu da sintetišu i druga fenolna jedinjenja, kao što su: cirsimaritin, kafeinska kiselina, karnozična kiselina, hlorogena kiselina, galna kiselina itd. (*Santos-Gomes i sar., 2002*).

Bitno je istaći da opisana *UHPLC/DAD/HESI-MS/MS* metoda omogućava brzu, pouzdanu i efikasnu identifikaciju jedinjenja od interesa, a to su u ovom slučaju nepetalaktoni i fenolne kiseline. Visoka kvalitativna i kvantitativna varijabilnost ove dve grupe jedinjenja kod vrsta roda *Nepeta*, kvalifikuje ih kao dobar marker sistem za procenu hemijskog diverziteta u okviru roda *Nepeta*. Prema tome, metoda koja je razvijena može imati širi značaj i primenu u hemotaksonomiji i populacionoj genetici, ali i praktičnu primenu prilikom odabira vrsta koje poseduju određene grupe jedinjenja od interesa.

### 5.1. Antioksidativna aktivnost *N. ratanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*

Poslednjih godina raste interesovanje za upotrebu prirodnih antioksidanasa u cilju očuvanja zdravlja, zbog njihove osobine da mogu da zaštite ćelije i organizam od oštećenja koja su izazvana oksidativnim stresom. Mnoga istraživanja pokazuju da su aromatične biljke, koje sadrže veliku količinu fenolnih jedinjenja dobar izvor prirodnih antioksidanasa (*Lamaison* i sar., 1991, *Tepe* i sar., 2007, *Erkan* i sar., 2009, *Sarahroodi* i sar., 2013). Osobine fenolnih jedinjenja kao što su antikancerogena, antimutagena i zaštitna uloga mogu se povezati sa njihovom antioksidativnim svojstvima da eliminišu slobodne radikale i sprečavaju lipidnu peroksidaciju (*Potter*, 2005). Pokazane su razlike u pogledu antioksidativne aktivnosti između glavnih grupa fenolnih jedinjenja. Flavonoidi pokazuju bolji antioksidativni potencijal u poređenju sa flavonolima, dok su derivati cimetine kiseline (kumarinska, kafeinska, ruzmarinska, ferulinska, sinapinska i hlorogena kiselina) bolji antioksidansi od derivata benzojeve kiseline (vanilinska, galna, elaginska, protokatehinska, siringinska i gentisinska kiselina) (*Soobratte* i sar., 2005). *Fadel* i sar. (2011) su pokazali da se molekuli ruzmarinske kiseline vezuju za polarne lipide ćelijske membrane pri čemu ne menjaju strukturu i propustljivost membrana, a dovode do sprečavanja lipidne peroksidacije u prisustvu reaktivnih kiseoničnih vrsta. Isti autori su takođe pokazali da ruzmarinska kiselina može prolaziti kroz membrane ne narušavajući njenu strukturu.

Nekoliko vrsta iz roda *Nepeta* je već analizirano u pogledu postojanja antioksidativne aktivnosti. *Tepe* i sar., (2007) su pokazali da postoji pozitivna korelacija između antioksidativne sposobnosti *N. flavida* i količine ukupnih fenolnih jedinjenja. Ekstrakt *N. meyeri* u acetonu koji sadrži veliku količinu fenolnih jedinjenja pokazuje redukujuću sposobnost prema *DPPH* i *NO* radikalima (*Cigremis* i sar., 2010). *Miceli* i sar. (2005) su antioksidativni potencijal metanolnog ekstrakta *N. sibthorpii* takođe pripisali fenolnim jedinjenjima, među kojima se kao dominantno fenolno jedinjenje izdvaja hlorogena kiselina. *Yazici* i sar., (2010) su odredili antioksidativni potencijal i količinu ukupnih fenolnih jedinjenja kod *N. italica*, *N. cilicia* i *N. caesarea*. Vrsta koja sadrži najviše fenolnih jedinjenja (*N. italica*) pokazala je i najveći antioksidativni potencijal.

Mnoge druge biljne vrste fam. *Lamiaceae* koje kao dominantna fenolna jedinjenja sadrže ruzmarinsku kiselinu pokazuju značajan antioksidativni potencijal, uključujući vrste *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare*, *Lycopus europaeus*, i druge (Lamaison i sar., 1991).

Za razliku od ekstrakata koji kao glavne komponente sadrže fenolna jedinjenja, etarska ulja *Nepeta* su se pokazala kao znatno slabiji antioksidansi. Etarska ulja *N. sessilifolia* i *N. laxiflora*, koja kao dominantna jedinjenja sadrže oksidovane monoterpenoide, pokazuju slabu antioksidativnu aktivnost (Safaei-Ghomi i sar., 2011). Mothana (2012) je pokazao slab antioksidativni potencijal etarskog ulja *N. deflersiana* koje sadrži preko 30% oksidovanih monoterpenoide i preko 30% oksidovanih seskviterpenoide. Takođe, etarsko ulje *Nepeta nuda* ssp. *albiflora* pokazuje slab antioksidativni potencijal (Alim i sar., 2009). Etarsko ulje *N. ispanica*, koje kao dominantno jedinjenje sadrži 1,8-cineol (78%), ne pokazuje antioksidativni potencijal (Salehi i sar., 2007). Etarsko ulje *N. foliosa*, koje takođe sadrži 1,8-cineole, nije redukovalo DPPH radikale. Dok etarsko ulje *Nepeta nuda* ssp. *nuda* pokazuje antioksidativni potencijal prema DPPH radikalu tek kada se primeni u visokim koncentracijama (Gkinis i sar., 2010).

DPPH i ABTS testom u našim eksperimentima je pokazano da najveći antioksidativni potencijal poseduje ekstrakt *N. nervosa* zatim *N. rtanjensis*, dok najslabiju sposobnost ka neutralizaciji DPPH i ABTS<sup>+</sup> radikala pokazuje ekstrakt *N. sibirica*. FRAP testom je takođe potvrđena velika sposobnost redukcije Fe<sup>3+</sup> od strane metanolnog ekstrakta *N. nervosa* i *N. rtanjensis*. S obzirom da u ekstraktu *N. nervosa* nije detektovano prisustvo nepetalaktona, antioksidativni potencijal se može pripisati detektovanim fenolnim kiselinama (ruzmarinska, kafeinska i hlorogena). U slučaju vrsta *N. rtanjensis* i *N. sibirica*, u metanolnim ekstraktima je pored fenolnih jedinjenja detektovana značajna količina *trans,cis*-nepetalaktona ili *cis,trans*-nepetalaktona. S ciljem da se razdvoji efekat fenola od efekta monoterpena na ukupni antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata ove dve vrste izvršeno je poređenje antioksidativnog potencijala ruzmarinske kiseline, hlorogene kiseline, etarskog ulja *N. rtanjensis* koje sadrži 72% *trans,cis*-nepetalaktona i etarskog ulja *N. cataria* koje sadrži 92% *cis,trans*-nepetalaktona.

Pokazano je da antioksidativni potencijal u najvećoj meri zavisi od fenolnih kiselina, dok je udeo etarskih ulja daleko manji. Pored toga, veću sposobnost neutralizacije *DPPH* i *ABTS*<sup>+</sup> radikala pokazuje ruzmarinska kiselina u poređenju sa hlorogenom. *Trans,cis*-nepetalakton ima bolji antioksidativni potencijal od *cis,trans*-nepetalaktona, ali neuporedivo slabiji od fenolnih jedinjenja koja su ispitana.

S obzirom na činjenicu da je ruzmarinska kiselina dominantno fenolno jedinjenje u metanolnim ekstraktima sve tri vrste iz roda *Nepeta*, logičan je zaključak da upravo ova fenolna kiselina najviše doprinosi njihovom antioksidativnom potencijalu. *FRAP* testom nije pokazan antioksidativni potencijal *trans,cis* i *cis,trans*-nepetalaktona, što ukazuje na to da sposobnost metanolnih ekstrakta ispitivanih vrsta da redukuje Fe<sup>3+</sup> potiče od fenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima: ruzmarinske, kafeinske, hlorogene i neohlorogene kiseline u slučaju *N. rtanjensis*, dok su kod *N. sibirica* to ruzmarinska, kafeinska i hlorogena kiselina.

Veliki broj autora antioksidativni potencijal vrsta iz fam. *Lamiaceae* pripisuje upravo ruzmarinskoj kiselini, kao u slučaju *N. menthoides* (Sarahroodi i sar., 2012), *Rosmarinus officinalis* (Erkan i sar., 2008), *Origanum vulgare* (Lamaison i sar., 1991), *Salvia virgata*, *Salvia staminea*, *Salvia verbenaca* (Tepe i sar., 2007), *Melissa officinalis* (Lamaison i sar., 1991). Kraujalis i sar. (2011) su *DPPH* testom ispitali antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakta *N. cataria*, *N. cataria* var. *citriodora*, *N. transcaucasica* i *N. bulgaricum* i pokazali da on u najvećoj meri zavisi od ruzmarinske kiseline koja je dominantno fenolno jedinjenje kod ovih vrsta. Isti autori su pokazali da postoji visok stepen korelacije između količine ruzmarinske kiseline u ispitivanom ekstraktu i antioksidativnog potencijala. Do sličnog su zaključka došli Tundis i sar. (2012), koji su *DPPH*, *ABTS* i *FRAP* testom pokazali da metanolni ekstrakti *N. crassifolia* i *N. binaludensis* pokazuju značajan antioksidativni potencijal, pri čemu se vrsta *N. crassifolia* odlikuje duplo višim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja i pokazuje jači antioksidativni potencijal. Rezultati ove disertacije su u skladu sa pomenutim istraživanjima. S obzirom da ekstrakt *N. nervosa* sadrži skoro tri puta više ruzmarinske kiseline od ekstrakta *N. sibirica*, shodno tome je i antioksidativni potencijal metanolnog ekstrakta *N. nervosa* znatno veći.



Antioksidativni potencijal metanolnog ekstrakta *N. rtanjensis* se može na prvom mestu pripisati ruzmarinskoj kiselini, a zatim i hlorogenoj kiselini. Iako metanolni ekstrakt *N. rtanjensis* sadrži veću količinu ukupnih fenola od ekstrakta *N. nervosa*, bolji antioksidativni potencijal ekstrakta *N. nervosa* se može pripisati većoj količini ruzmarinske kiseline nego kod *N. rtanjensis*. Takođe, uzrok slabijeg antioksidativnog potencijala ekstrakta *N. rtanjensis* može biti antagonističko delovanje između glavnih komponenti metanolnog ekstrakta, kako između fenolnih jedinjenja, tako i između fenolnih jedinjenja i velike količine *trans,cis*-nepetalaktona. *Iacopini* i sar., (2008) su pokazali da se antioksidativni potencijal katehina, epikatehina, kvercetina i rutina razlikuje u slučaju kada se primenjuju kao posebna jedinjenja i u slučaju kada se naprave smeše ovih fenola, zaključivši pri tome da fenoli mogu imati sinergistički ili antagonistički efekat na ukupnu antioksidativnu aktivnost smeše. Takođe je pokazan sinergistički efekat prilikom određivanja antioksidativnog potencijala glavnih fenolnih jedinjenja u ekstraktu *Olea europaea* (*Benavente-Garcia* i sar., 2000). Količina ukupnih fenolnih jedinjenja nije obavezno pokazatelj antioksidativne aktivnosti nekog ekstrakta, već se mora uzeti u obzir da dolazi do sinergističkih ili antagonističkih interakcija između pojedinačnih komponenti uzorka, što u velikoj meri zavisi od njihove strukture (*Kratchanova* i sar., 2010).

Metanolni ekstrakti *N. rtanjensis* i *N. sibirica* su pokazali znatno bolju sposobnost redukcije *DPPH* i *ABTS*<sup>+</sup> radikala u poređenju sa etarskim uljima, koja kao dominantne komponente sadrže nepetalaktone, što ide u prilog činjenici da antioksidativni potencijal ispitivanih vrsta roda *Nepeta* u najvećoj meri zavisi od fenolnih jedinjenja. Naši rezultati su u korelaciji sa ranije objavljenim istraživanjima koja pokazuju veoma slab antioksidativni potencijal etarskih ulja *Nepeta*, dok ekstrakti koji sadrže fenolna jedinjenja pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost (*Miceli* i sar., 2005, *Proestos* i sar., 2006, *Salehi* i sar., 2007, *Tepe* i sar., 2007, *Alim* i sar., 2009, *Cigremis* i sar., 2010, *Mahboubi* i sar., 2011, *Kraujalis* i sar., 2011, *Mothana* i sar., 2012., itd.). *Mahboubi* i sar. (2011) su pokazali da etarsko ulje *N. persica* koje kao dominantno jedinjenje sadrži 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -nepetalakton (80%) pokazuje veoma slab antioksidativni potencijal, dok etanolni ekstrakt ove vrste pokazuje visoku sposobnost redukcije *DPPH* radikala.

Takođe, i etarsko ulje *N. cataria* koje kao dominantna jedinjenja poseduje 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -nepetalakton (70%), 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalakton (6%) i 4 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalakton (2%), nije pokazalo sposobnost redukcije prema stabilnom *DPPH* radikalu, dok metanolni ekstrakt ove vrste, koji sadrži veoma malu količinu ukupnih fenola, pokazuje slab antioksidativni potencijal (*Adiguzel i sar.*, 2009, *Proestos i sar.*, 2006).

Antioksidativni potencijal tri vrste roda *Nepeta* na osnovu naših rezultata se može pripisati fenolnim kiselinama prisutnim u ekstraktu, naročito ruzmarinskoj kiselini, dok terpenoidna jedinjenja imaju veoma slab antioksidativni potencijal.

## 5.2. Antimikrobna aktivnost *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa*

Jedinjenja izolovana iz biljaka su jedan od glavnih izvora novih terapijskih agenasa za različite bolesti uključujući i bolesti izazvane patogenim mikroorganizmima (*Sakagami i sar.*, 2002). Intenzivne studije su u poslednje vreme usmerene ka ispitivanju mogućnosti upotrebe biljnih ekstrakata i etarskih ulja aromatičnih biljnih vrsta u tretmanima protiv patogenih bakterija i gljiva (*Chalchat i sar.*, 1998, *Salehi i sar.*, 2007).

Mnogi autori su opisali antimikrobno dejstvo etarskog ulja vrsta roda *Nepeta*, uključujući *N. ciliaris* (*Gautam i sar.*, 2012), *N. crispa* (*Sonboli i sar.*, 2004), *N. septemcrenata* (*El-Moaty*, 2010), *N. leavigata*, *N. kurramensis* (*Shinwari i sar.*, 2013), *N. juncea* (*Hussain i sar.*, 2009), *N. nuda* ssp. *albiflora* (*Alim i sar.*, 2009), *N. meyeri* (*Cigremis i sar.*, 2010), *N. fassenii* (*Nedorostova i sar.*, 2009) i *N. italica* (*Emre i sar.*, 2011). Kao aktivna komponenta etarskih ulja navedenih vrsta uglavnom se pominje nepetalakton. Pored nepetalaktona i neki od oksidovanih monoterpenoida etarskih ulja, kao što su kamfor, eugenol, borneol i linalol su opisani kao antimikrobna jedinjenja (*Carson i Riley*, 1995). *Adiguzel i sar.* (2009) su pokazali antimikrobnu aktivnost etarskog ulja *N. cataria*, koje sadrži 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -nepetalakton (70%), 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalakton (6%) i 4 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalakton (2%), još neki autori su pokazali antimikrobnu aktivnost etarskog ulja ove vrste, pri čemu se dominantna komponenta etarskih ulja- nepetalakton smatra odgovornim za ispitanu biološku aktivnost (*Bourel i*

sar., 1993., *Nostro* i sar., 2000, *Zomorodian* i sar., 2012). Etarsko ulje *N. deflersiana*, koje pokazuje slabu antimikrobnu aktivnost, sadrži samo 30% oksidovanih monoterpenoida (*Mothan*, 2012). *N. persica* kao dominantno jedinjenje etarskog ulja sadrži 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -nepetalakton (80%) i pokazuje antibakterijsku aktivnost na *Staphylococcus aureus* i *Klebsiella pneumoniae*, kao i antifungalno dejstvo na gljive kao što su *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* i *A. niger*. *N. crispa* sadrži 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -nepetalakton, 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalakton i 4 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalakton, od kojih je *trans,cis*- izomer (4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalakton) dominantno jedinjenje etarskih ulja, i poseduje antimikrobnu aktivnost na veliki broj bakterijskih i gljivičnih vrsta, uključujući *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* i *Microsporium gypsiium*. *Zenasni* i sar. (2008) su pokazali antimikrobno dejstvo etarskih ulja *N. atlantica* i *N. tuberosa* koje sadrže preko 80% 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalaktona. Poređenjem antimikrobne aktivnosti etarskih ulja *N. leucophylla*, *N. discolor*, *N. govaniana*, *N. clarkei*, *N. elliptica* i *N. erecta* pokazano je da vrste koje kao glavnu komponentu poseduju 4 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,7 $\beta$ -nepetalakton (*N. elliptica* i *N. erecta*, u količini od preko 83%) pokazuju bolju antimikrobnu aktivnost u poređenju sa drugim ispitivanim vrstama koje ovaj monoterpenski lakton sadrže samo u tragovima (*Bisht* i sar., 2010). Prema tome, etarska ulja *Nepeta*, koja kao dominantno jedinjenje sadrže nepetalaktone, pokazuju snažno antibakterijsko i antifungalno dejstvo (*Sonboli* i sar., 2004).

U ovoj disertaciji je po prvi put ispitano antimikrobno dejstvo metanolnih ekstrakata *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa* na osam vrsta bakterija i osam vrsta gljiva. Metanolni ekstrakt *N. rtanjensis* je pokazao najbolju antimikrobnu aktivnost, a kod najvećeg broja testiranih bakterija (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae* i *S. typhimurium*) aktivnost je bila na nivou referentnog antibiotika streptomocina. Takođe, metanolni ekstrakt *N. rtanjensis* je pokazao jaču aktivnost od streptomocina na bakteriju *L. monocytogenes*. Metanolni ekstrakt *N. nervosa* pokazuje istu (*B. cereus*, *M. flavus*, *S. aureus*, *E. cloacae*) ili bolju (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*) antimikrobnu aktivnost u poređenju sa ekstraktom *N. sibirica*. Ekstrakt *N. rtanjensis* je generalno pokazao najjaču antifungalnu aktivnost u poređenju sa druge dve ispitivane vrste, pri čemu je zabeležena aktivnost bolja od referentnog fungicida

ketokonazola. Ekstrakti *N. nervosa* i *N. sibirica*, koji se nisu značajno razlikovali u pogledu antifungalne aktivnosti, pokazuju znatno slabiju aktivnost od primenjenog komercijalnog fungicida. Kako je u metanolnom ekstraktima tri ispitivane vrste roda *Nepeta* fitohemijskim analizama pokazan različit sastav u pogledu prisustva i količine glavnih grupa monoterpenoida i fenolnih jedinjenja upravo se različitom kvantitativnom i kvalitativnom sastavu komponenti metanolnih ekstrakata može pripisati antimikrobno dejstvo. Takođe se može pretpostaviti da dolazi i do sinergističkog delovanja između terpenskih jedinjenja prisutnih u ekstraktima i fenolnih jedinjenja, kao i između samih fenolnih jedinjenja. *Nostru* i sar. (2000) takođe navode moguću sinergistički efekat glavnih jedinjenja u metanolnom i dihlor metanskom ekstraktu, u ispoljavanju antimikrobnog dejstva *N. cataria*.

Najbolja antimikrobna aktivnost metanolnog ekstrakta *N. rtanjensis* se može pripisati visokom sadržaju *trans,cis*-nepetalaktona (4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ ), kao i prisutnim fenolnim kiselinama, od kojih su ruzmarinska i hlorogena dominantne. S obzirom da je u ekstraktu *N. nervosa* *cis,trans*-nepetalakton detektovan samo u tragovima, postojeća antimikrobna aktivnost verovatno potiče od velike količine ruzmarinske kiseline prisutne u ekstraktu. Antimikrobna aktivnost metanolnog ekstrakta *N. sibirica* se može pripisati dominantnoj komponenti metanolnog ekstrakta *cis,trans*-nepetalaktonu (4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ), a u manjoj meri i detektovanim fenolnim kiselinama, s obzirom da je količina ruzmarinske kiseline u metanolnom ekstraktu ove vrste za trećinu niža nego u ekstraktima *N. rtanjensis* i *N. nervosa*. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa ranije objavljenim podacima za druge vrste iz roda *Nepeta*. *Lee* i sar., (2010b) su antimikrobno dejstvo *N. cataria* pored nepetalaktona pripisali i ruzmarinskoj kiselini. Pored vrsta roda *Nepeta* antimikrobno dejstvo ispitano je i kod drugih vrsta iz familije *Lamiaceae*. *Adiguzel* i sar. (2007) su pokazali jako antimikrobno dejstvo metanolnog ekstrakta *Satureja hortensis*. Metanolni ekstrakt *Teucrium scordium* pokazuje antibakterijsko dejstvo na sve testirane Gram-negativne bakterije (*Kundaković* i sar., 2011), a metanolni ekstrakt *Origanum majorana* pokazuje jaču antifungalnu aktivnost od nistatina u sprečavanju rasta *Aspergillus niger* (*Leja* i *Thoppil*, 2007). Takođe, pokazana je veoma slaba antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata *Salvia cryptantha*, *S. multicaulis* i *Mentha longifolia* ssp. *longifolia* (*Gulluce* i sar., 2007, *Tepe* i sar., 2004).

Mora se naglasiti da i stereochemija prisutnih monoterpenskih laktona može imati ključnu ulogu u ostvarivanju antimikrobne aktivnosti. Kalpoutzakis i sar. (2001) su pokazali da *trans,cis*-stereoizomer nepetalaktona ima znatno veću antibakterijsku aktivnost na *Helicobacter pylori* od *cis,trans*-nepetalaktona. S obzirom da je pokazano snažnije antimikrobno dejstvo metanolnog ekstrakta *N. rtanjensis* od dejstva ekstrakta *N. sibirica*, ovakvi rezultati se u velikoj meri mogu pripisati različitom kvalitativnom sastavu nepetalaktona u njima. Takođe, može se zaključiti da *trans,cis*-izomer nepetalaktona pokazuje jače antibakterijsko i antifungalno dejstvo od *cis,trans*-nepetalaktona.

Ranija istraživanja su pokazala postojanje antimikrobne aktivnosti vrste *N. rtanjensis*, i ona su u skladu sa našim rezultatima. Stojanović i sar. (2005) su opisali antibakterijsko dejstvo etarskih ulja na nekoliko sojeva Gram-pozitivnih bakterija i jako antifungalno dejstvo na *Aspergillus niger*. Ljaljević-Grbić i sar. (2011a) su pokazali dejstvo etarskog ulja rtanjske metvice tokom prvih faza aseksualnog životnog ciklusa gljiva (klijanje konidija), i to na vrstu koja je izolovana sa lista i semena *N. rtanjensis*, *Alternaria* sp., kao i na *Cladosporium cladosporioides* i *Trichoderma viride*. Pokazano je da su spore *Alternaria* sp. rezistentne na primenjeno etarsko ulje. Ljaljević-Grbić i sar. (2011b) su takođe pokazali antifungalno dejstvo etarskog ulja *N. rtanjensis* na ljudskog patogena *Bipolaris spicifera* koji izaziva alergijski sinuzitis. U literaturi nisu poznati rezultati biološke aktivnosti *N. sibirica* i *N. nervosa*. Rezultati ove disertacije opisuju snažno antimikrobno dejstvo metanolnih ekstrakata *N. sibirica*, *N. nervosa* i naročito *N. rtanjensis*, na seriju bakterija i gljiva, i ukazuju na mogućnost njihove primene u praksi, u prevenciji i lečenju bolesti i zaraza izazvanih patogenih mikroorganizama.

Poznat je veliki broj bakterijskih vrsta koje narušavaju ispravnost prehrambenih proizvoda oslobađajući mnogobrojne ekstracelularne toksine. Neke od najčešćih bakterija koje su izazivači intoksikacije ili infekcije kod ljudi, uzrokovanih konzumiranjem kontaminirane hrane ili vode su: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Trichinella spiralis*, *Yersinia enterocolitica*, *Arcobacter butzleri*, *Cryptosporidium parvum*, *Legionella pneumophila*, itd (Jay i sar., 2005).

Bakterije koje su korišćene u našim testovima, kao što su *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, narušavanjem ispravnosti prehrambenih proizvoda, mogu dovesti do fatalnih infekcija i bolesti kod ljudi i životinja. Uobičajeno stanište za *B. cereus* su prašina, voda i zemlja i ove bakterije se često mogu naći na površini mesa.

Ova bakterija uzrokuje kvarenje sireva i pasterizovanog mleka. *B. cereus* može proizvoditi termolabilan enterotoksin koji uzrokuje dijareju (dijaretički), i termostabilan toksin koji kod ljudi uzrokuje povraćanje (emetički-cereulid) (Agata i sar., 2002, Jay i sar., 2005). *L. monocytogenes* se može naći u neprerađenom mesu i mleku kao i na svežem povrću. Ljudsku listeriozu može izazvati bilo koji od 13 serotipova *L. monocytogenes*, a meningitis ili meningoencefalitis je najteža manifestacija ove bolesti kod odraslih (Dalton i sar., 1997, Juraldo i sar., 1993, Schlüter i sar., 1996). Stafilokokni enterotoksini vrste *S. aureus* mogu izazvati upalne procese u stomaku i crevima (gastroenteritis) (Loir i sar., 2003). *Salmonella* sp. može biti prisutna u crevnom traktu i drugim tkivima živine i životinja sa crvenim mesom, a da se pri tome kod te životinje ne javi nijedan očigledan simptom oboljenja. Veoma često se nalaze u jajima mada je pokazana njihova adaptacija i na namirnice biljnog porekla (Samelis i sar., 2001, Wells i Butterfield, 1997). Salmoneloze ljudi obuhvataju sledeće grupe oboljenja: opšta ciklična zarazna oboljenja (tifus i paratifusi), uzročnik tifusa je *S. typhi*, a paratifusa *S. paratyphi*. Salmonele dovode i do toksikoinfekcija čiji su najčešći uzročnici *S. enteritidis*, *S. typhimurium* i *S. choleraeuis*. *P. aeruginosa* se kod ljudi nalazi u malom broju kao deo fiziološke mikroflore creva, a može se naći i na koži. U slučajevima poremećene ravnoteže u bakterijskoj flori creva, može izazvati enterokolitis (Forestier i sar., 2008). *E. coli* je čest uzrok kvarenja mesa i mlečnih prerađevina i kod ljudi može dovesti do pojave hemoragičnog kolitisa i hemolitične uremije (Belongia i sar., 1991).

Sekundarni metaboliti gljiva poznatiji kao mikotoksini predstavljaju veliku opasnost po zdravlje ljudi i mogu dovesti do nastanka mnogih zdravstvenih problema uključujući čak i kancer i neurološke poremećaje (Bhat i sar., 2010). Mikromicete koje su izazivači štetnog dejstva u prehrambenoj industriji zbog potencijalne proizvodnje mikotoksina uključuju rodove: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Trichothecium*, *Byssosclamyces* i *Sclerotinia* (Kavanagh i sar., 2005).

Ove mikrogljive mogu kontaminirati žitarice, pre i posle žetve, prilikom neadekvatnog skladištenja i mogu se naći u hrani za životinje i ljude. Neki od mikotoksina koje proizvode vrste korišćene u našim testovima su aflatoksini, ciklopiazonična kiselina (*A. flavus*), ohratoksin A i ohratoksin B, ksantomegnin, viomelein (*A. ochraceus*), gliotoksin (*A. fumigatus*), deoksinivalenol (DON), diacetokscirpenol (DAS), zearalenon, T2 mikotoksin (*F. sporotrichioides*), trihotoksin A (*T. viride*), griseofulvin, roquefortin C, ketoglobosin B, verukulogen, penitrem A, patulin, ohratoksin A, B i C, citrinin, ksantomegnin (*Penicillium*) (Hedayati i sar., 2007, Harris i Mantle, 2001, Bauer i sar., 1989, Madheswaran i sar., 2004, Hou i sar., 1972, Sokolović i Šimpraga, 2006).

Usled visoke i specifične antimikrobne aktivnosti, metanolni ekstrakti ispitivanih vrsta roda *Nepeta* se mogu preporučiti za prevenciju ili za lečenje intestinalnih oboljenja kod ljudi i životinja koja su nastala usled različitih bakterijskih ili gljivičnih infekcija. Tako se metanolni ekstrakt *N. rtanjensis* može koristiti za lečenje poremećaja nastalih delovanjem bakterijskih vrsta kao što su *M. flavus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* i *L. monocytogenes*. Ekstrakti sve tri vrste iz roda *Nepeta* koje su korišćene u ovom radu, zbog jačeg antifungalnog dejstva od komercijalnih fungicida bifonazola i ketokonazola, mogu se preporučiti za suzbijanje infekcija izazvanih vrstama gljiva kao što su: *F. sporotrichoides*, *F. fulvum*, *T. viride*, *P. ochrochloron*, *P. funiculosum*, *A. ochraceus*, *A. flavus* i *A. fumigatus*.

### **5.3. Alelopatsko dejstvo *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i *N. nervosa***

Veliki broj jedinjenja biljnog porekla može uticati na rastenje i razviće drugih biljnih vrsta u neposrednom okruženju biljke koja ih emituje. Različite grupe prirodnih jedinjenja su okarakterisane kao jedinjenja koja imaju stimulatívni ili u većini slučajeva inhibítorni efekat na druge biljne vrste, a ovakva jedinjenja su jednim imenom okarakterisana kao alelohemikalije. Alelohemikalije direktno utiču na mnoštvo biohemijjskih i fizioloških procesa, pa i na klijanje semena i rast i razviće biljnih organa klijanaca susednih biljnih vrsta (Weir i sar., 2004). Neisparljiva jedinjenja svoj alelopatski efekat uglavnom ostvaruju tako što dospevaju u životnu sredinu eksudacijom preko korena ili raspadanjem biljnih ostataka.

U grupu jedinjenja sa alelopatskim dejstvom se ubrajaju flavonoidi, fenoli, derivati cimetine kiseline (p-kumarinska, kafeinska, ferulinska kiselina) alkaloidi, ketoni, alkoholi, cijano-glikozidi, prosti nezasićeni laktoni, benzohinoni, antrahinoni, kompleksni kinini, kumarini, tanini (Rice i sar., 1984, Friedman i Walker, 1983, Putnam, 1985, Waller, 1989, Mitić i sar., 2012, Lee i sar., 2010c).

Pored toga, različita isparljiva jedinjenja iz klase terpena, koja u spoljašnju sredinu dospevaju emisijom sa površine nadzemnih delova biljaka, pokazuju značajan alelopatski potencijal. Neki autori su opisali alelopatski efekat etarskih ulja aromatičnih biljnih vrsta iz fam. *Lamiaceae* (Poser i sar., 1996, Dudai i sar., 1999, Angelini i sar., 2003, Islam i Kato-Noguchi, 2012). Kao potencijalna monoterpenska alelopatska jedinjenja se navode: cineol i citronelol (Romagni i sar., 2000, Singh i sar., 2002, Singh i sar., 2004), citronelal (Singh i sar., 2002) kamfor (Schulz i sar., 2007), 1,8-cineol,  $\beta$ -pinen (Nishida i sar., 2005),  $\alpha$ -pinen (Singh i sar., 2006a, Kordali i sar., 2007), linalol (Singh i sar., 2002),  $\gamma$ -terpinen (Kordali i sar., 2007),  $\beta$ -citronelen (Kordali i sar., 2007), itd. Mutlu i Atici (2009) su pokazali alelopatski efekat vodenog ekstrakta *N. meyeri* na klijanje semena i rast klijanaca poljoprivrednih vrsta kao što su pšenica, ječam i suncokret. Kasnije je pokazan i alelopatski efekat etarskog ulja iste vrste, koje sadrži 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$  nepetalakton (83,4%) i 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -nepetalakton (8,83%), na klijanje i rast nekih korovskih vrsta kao što su *Amaranthus retroflexus*, *Bromus danthoniae*, *Bromus intermedius*, *Chenopodium album*, *Cynodon dactylon*, *Portulaca oleracea* (Mutlu i sar., 2011). Pretpostavlja se da alelopatski efekat ove vrste u najvećoj meri potiče od nepetalaktona. Hyun Eom i sar., (2006) su pokazali alelopatski potencijal isparljivih jedinjenja *N. fassenii* na rast klijanaca kresa. U atmosferi u kojoj su rasla semena kresa detektovan je veliki broj isparljivih jedinjenja kao što su: 1,8-cineol,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -kopaen, germakren D,  $\beta$ -farnezen, ocimen, neril-acetat i *cis,trans*-nepetalakton koji predstavlja dominantno jedinjenje (73%). Primećeno je da isparljiva jedinjenja *N. fassenii* u velikoj meri dovode do inhibicije rasta nadzemnog dela i korena klijanaca kresa.

U ovoj disertaciji je ispitan alelopatski potencijal isparljivih jedinjenja tri vrste roda *Nepeta* na klijanje semena, rasteње i razviće klijanaca test vrste *Lepidium sativum*.



Razvijen je eksperimentalni sistem u kome je izvršena *in vitro* ko-kultivacija nepeta i *L. sativum*, a sa ciljem da se eksperimentalni uslovi što više približe realnim dešavanjima u prirodi, te da se isprati alelopatski efekat isparljivih jedinjenja iz atmosfere, u neposrednom okruženju jedinki iz roda *Nepeta* koje ih emituju. U ranijim istraživanjima su obično korišćena etarska ulja biljaka sa potencijalnim alelopatskim dejstvom (Poser i sar., 1996, Dudai i sar., 1999, Angelini i sar., 2003, Verdeguer i sar., 2009, Kordali i sar., 2008, Mutlu i sar. 2011 itd.).

Ovakvi eksperimenti obično ne daju realnu sliku o interakcijama između biljaka u prirodi, ali su značajni u potrazi za novim bioherbicidima koji se mogu koristiti u poljoprivrednoj praksi. Fundamentalna istraživanja alelopatskih interakcija zahtevaju odabir odgovarajućih test vrsta čija semena brzo, uniformno i kompletno kličaju, kao u slučaju vrste *L. sativum*, i omogućavaju ponovljivost rezultata. U slučaju praćenja alelopatskog efekta isparljivih jedinjenja, jako je važno obezbediti analizu njihove koncentracije u atmosferi neposredno u okruženju test vrsta. Ovo može biti ograničavajući faktor u eksperimentima koji se rade na otvorenom prostoru, tj. na polju. Gajenje biljaka u uslovima *in vitro*, u atmosferi ograničene i konstantne zapremine, omogućilo je da u našim eksperimentima izvršimo kvantifikaciju isparljivih jedinjenja od interesa PTR-MS analizom, što čini opisani eksperimentalni sistem veoma pogodnim u fundamentalnim istraživanjima alelopatskih interakcija. U literaturi su vrlo oskudni podaci o ispitivanju alelopatskih interakcija *in vitro* ko-kultivisanjem potencijalne alelopatske vrste koja emituje isparljiva jedinjenja i test vrste. Yang i Futsuhara (1991) su opisali inhibitorni efekat isparljivih jedinjenja oslobođenih od strane kalusa pirinča na rast kalusa soje u ko-kulturi *in vitro*.

Najmanji procenat klijanja kao i najslabiji rast nadzemnog dela i korena klijanaca kresa primećen je u ko-kulturi sa *N. ratanjensis*. Kako je *trans,cis*-nepetalakton dominantno jedinjenje u atmosferi posude za gajenje biljaka, dok se ostala isparljiva jedinjenja (*cis,trans*-nepetalakton,  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -kopaen, germakren D) nalaze samo u tragovima, upravo se ovom jedinjenju može pripisati inhibitorni efekat na klijanje i rast i razviće biljnih organa. Inhibitorni efekat na klijanje i rast klijanaca test vrste u ko-kulturi sa *N. sibirica* može se pripisati *cis,trans*-nepetalaktonu, koji je dominantno isparljivo jedinjenje u atmosferi posude za gajenje biljaka.

Ostala isparljiva jedinjenja su detektovana u znatno nižoj koncentraciji ( $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -farnezen,  $\alpha$ -zingiberen). Alelopatski efekat je izraženiji prilikom ko-kulivacije kresa sa *N. rtanjensis* nego sa *N. sibirica*, što ukazuje na snažnije alelopatsko dejstvo *trans,cis*-nepetalaktona od *cis,trans*-nepetalaktona. Može se pretpostaviti da je stereochemija nepetalaktona veoma bitna za ostvarivanje alelopatskog potencijala. Ranije je takođe pokazano da stereochemija nekih monoterpena značajno određuje njihov alelopatski potencijal.

*Nishida* i sar. (2005) navode alelopatski potencijal  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena, ukazujući na to da  $\beta$ -pinen u visokim koncentracijama inhibira klijanje semena test vrste, dok  $\alpha$ -pinen ne utiče na klijanje ali ima efekat na inhibiciju rasta korena. S obzirom da u ko-kulturi kresa i *N. nervosa* nije uočena inhibicija klijanja i rasta klijanaca kresa, a istovremeno nije detektovan ni nepetalakton u atmosferi posuda za gajenje biljaka, još jednom je potvrđena pretpostavka da su nepetalaktoni u najvećoj meri odgovorni za alelopatske interakcije. Alelopatski efekat isparljivih jedinjenja koje u atmosferu emituju *N. rtanjensis* i *N. sibirica* ogleda se u usporenoj dinamici klijanja semena kresa, što dalje dovodi do usporenog rastevanja i razvića klijanaca u poređenju sa kontrolom. Takođe, pokazana je značajna korelacija između koncentracije nepetalaktona u atmosferi posuda za gajenje kultura *in vitro* i procenta klijanja semena.

S obzirom da je atmosfera posuda za gajenje kultura zasićena isparljivim jedinjenjima koja se emituju sa površine izdanaka *N. rtanjensis* i *N. sibirica*, a da su osim nepetalaktona, koji je prisutan kao dominantno jedinjenje u oba slučaja, detektovana i druga monoterpenska jedinjenja za koje je ranije pokazano alelopatsko dejstvo ( $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena), pokušali smo da razdvojimo udeo pojedinačnih jedinjenja u celokupnom alelopatskom potencijalu. *Singh* i sar. (2006a) su pokazali da  $\alpha$ -pinen neznatno usporava klijanje testiranih vrsta i usporava rast korena klijanaca izazivajući oksidativni stres, dok su *Abraham* i sar. (2003) pokazali da ovo jedinjenje usporava rast klijanaca kukuruza tako što izaziva oksidativnu fosforilaciju i sprečava transporta elektrona u mitohondrijama. *Jones* i sar. (2012) alelopatski potencijal etarskih ulja *Lamium amplexicaule* i *L. purpureum* pripisuju njegovim glavnim komponentama  $\alpha$ -pinenu i  $\beta$ -pinenu.

Ispitano je dejstvo etarskog ulja *N. rtanjensis* koje sadrži oko 73% *trans,cis*-nepetalaktona, etarskog ulja *N. cataria* sa 90% *cis,tran*-nepetalaktona, kao i  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena na klijanje semena odabranih poljoprivrednih kultura i korovskih vrsta. Zaključeno je da *trans,cis*-stereoizomer nepetalaktona najviše utiče na usporavanje dinamike klijanja ili zaustavljanja klijanja semena testiranih vrsta. Uočen je visok stepen osetljivosti semena *Lepidium sativum*, *Lactuca sativa*, *Lotus corniculatus*, *Stelaria media*, *Arabidopsis thaliana* na alelopatsko dejstvo etarskog ulja *N. rtanjensis*, koje se može pripisati *trans,cis*-nepetalaktonu. Postojanje inhibicije klijanja i usporene dinamike klijanja semena *L. sativum*, *Lactuca sativa*, *Stelaria media*, *Arabidopsis thaliana* u atmosferi etarskog ulja *N. cataria* se može objasniti visokom koncentracijom *cis,trans*-nepetalaktona. Hyun Eom i sar., (2006) navode *cis,trans*-nepetalakton vrste *N. fassennii* kao jedinjenje sa alelopatskim potencijalom, dok Mutlu i sar., (2009, 2011) navode *trans,cis*-nepetalakton vrste *N. meyeri* kao alelohemikaliju. Blago usporena dinamika klijanja semena *L. sativum*, *Lactuca sativa*, *Stelaria media*, *Arabidopsis thaliana* ukazuje na postojanje određenog alelopatskog potencijala  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -pinena, mada znatno slabijeg od nepetalaktona, naročito njegovog *trans,cis*-izomera. Takođe, primećen je neznatno jači alelopatski efekat  $\beta$ -pinena u poređenju sa  $\alpha$ -pinenom.

Alelopatska svojstva nekih biljaka i pojedinih proizvoda njihovog sekundarnog metabolizma mogu se uspešno primeniti u poljoprivrednoj praksi, a u cilju suzbijanja i kontrole korovskih vrsta i biljnih patogena. Dugogodišnja i opsežna istraživanja su omogućila selekciju značajnog broja biljaka sa alelopatskim potencijalom, uključujući i neke poljoprivredne kulture, i pokazala da primena ovakvog biljnog materijala u praksi može značajno redukovati biomasu korovskih vrsta, i samim tim povećati prinos poljoprivrednih kultura. Brojni su primeri alelopatskih interakcija između poljoprivrednih kultura i korovskih vrsta (Leather, 1983, Wu i sar., 1999, Weston, 1996, 2003, Xuan i sar., 2005). Biološka borba protiv korovskih vrsta i biljnih patogena je danas trend u svetu, koji u bliskoj budućnosti treba da preovlada nad upotrebom herbicida i pesticida u poljoprivrednoj proizvodnji. Zbog toga, potraga za novim, prirodnim izvorima alelohemikalija može imati veliki značaj za razvoj bioherbicida i biopesticida. Ono što mora da predhodi upotrebi novih bioherbicida i biopesticida u polju, jeste jasno definisanje načina primene, kao i precizno određivanje vremena tretiranja u zavisnosti od vegetacionog perioda poljoprivrednih kultura.

Takođe, mora se jasno sagledati uticaj novih alelohemikalija na široki spektar korovskih vrsta i poljoprivrednih kultura, kako bi se unapred mogle predvideti interakcije u okviru poljoprivrednih ekosistema.

Preliminarna istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, koja u budućnosti mogu dovesti do praktične primene etarskih ulja različitih vrsta iz roda *Nepeta*, kao i nepetalaktona u suzbijanju i kontroli korovskih vrsta, ukazuju na potrebu da se jasno definišu poljoprivredne kulture na koje se ovi potencijalni bioherbicidi mogu primeniti i jasno odredi u kojoj fazi njihovog vegetativnog ciklusa treba uraditi tretman. Pored toga, treba precizirati efektivnu dozu, koja će dovesti do željenog efekta, tj. do suzbijanja korovskih vrsta, a neće uticati na normalno rastenje i razviće poljoprivrednih kultura. Naime, rezultati su pokazali da poljoprivredne kulture pokazuju različitu osetljivost na alelopatsko dejstvo etarskih ulja bogatih nepetalaktonima. Od analiziranih poljoprivrednih kultura, visoku osetljivost u fazi klijanja semena na ispitivana etarska ulja pokazale su vrste *Lepidium sativum*, *Lactuca sativa*, *Lotus corniculatus*, pri čemu je osetljivost u korelaciji sa primenjenom koncentracijom etarskih ulja. Prema tome, u slučaju ovih vrsta je neophodno da tretman etarskim uljima sledi nakon faze klijanja semena i prvih faza rasteња i razvića. S druge strane, uljana repica (*Brassica napus*) je pokazala slabu osetljivost na alelopatski efekat obe vrste etarskih ulja u primenjenim koncentracijama. To ukazuje na veliki potencijal primene etarskih ulja kao bioherbicida u zasadima uljane repice, bez bojazni da će primenjeni tretman uticati na rastenje i razviće ove poljoprivredne kulture, a samim tim i na prinos. Neophodno je u istraživanja uključiti i druge poljoprivredne kulture, ali i ispitati alelopatski efekat u različitim fazama razvića. Kada govorimo o korovskim vrstama koje su korišćene u našim biotestovima, najveću osetljivost na alelopatski efekat etarskih ulja *N. rtanjensis* i *N. cataria* pokazala je vrsta *Stelaria media*, kod koje je čak i na vrlo niskim koncentracijama nepetalaktona uočena potpuna inhibicija klijanja semena. Dobijeni rezultati ukazuju na veliki potencijal primenjenih etarskih ulja u suzbijanju ove korovske vrste, koja može naneti velike štete nekim poljoprivrednim usevima. *A. thaliana* je takođe pokazala značajnu osetljivost na etarska ulja obe vrste, kada su ona primenjena u visokim koncentracijama, dok je vrsta *Rumex crispus* tolerantnija u tom pogledu i kod nje je uočena samo blago usporena dinamika klijanja semena.

Dalja istraživanja će imati za cilj da ukažu na alelopatski potencijal etarskih ulja *N. rтанjensis* i *N. cataria* kod većeg broja korovskih vrsta. Ono što se generalno može zaključiti jeste da etarsko ulje *N. rтанjensis* koje se odlikuje visokim sadržajem *trans,cis*-nepetalaktona ima snažno alelopatsko dejstvo na većinu analiziranih vrsta, te mu se zbog toga može dati prednost u daljim istraživanjima i može se preporučiti kao potencijalni visoko efikasni bioherbicid.

Većina zrelih semena skrivenosemenica se sastoji od embriona koji je okružen endospermom i semenjačom. Zrela semena vrste *Arabidopsis thaliana*, i njenog bliskog srodnika *Lepidium sativum*, poseduju tanki endosperm, izgrađen od 1-2 sloja ćelija, koji pokriva embrion. Hranljive materije su uglavnom uskladištene u kotiledonima (Miller i sar., 2006). U poslednje vreme se pominje značajna uloga endosperma u kontroli klijanja semena (Lee i sar., 2010a). Pucanje semenjače se odvija duž preformirane linije cepanja, čime radikula ostaje okružena samo endospermom. Do probijanja endosperma dolazi nakon omekšavanja kape endosperma, posle čega potencijal rasta radikule može prevazići otpor mikropilarne kape endosperma. Procesi kao što su rast embriona i omekšavanje endosperma regulišu fitohormoni (ABA, GA) i u njima učestvuju brojni hidrolitički enzimi (manaze, celulaze i glukanaze, i dr.), ekspanzini i ROS u apoplastu (Ni i Bradford, 1993, Toorop i sar., 2000, Petruzzelli i sar., 2003, Bailly i El-Maarouf-Bouteau, 2008; Da Silva i sar., 2008; Müller i sar., 2009; Morris i sar., 2011; Voegelé i sar., 2011). Hidrolitički enzimi najverovatnije učestvuju u modifikaciji ćelijskog zida i dovode do njegovog slabljenja tokom procesa omekšavanja endosperma (Oracz i sar., 2009). Semena kresa koja su korišćena u našim eksperimentima pripadaju grupi semena koja klijanju u dva koraka. Najveće metaboličke promene kod ovakvih semena se dešavaju prilikom faze I -imbibicije- suva semena imaju veoma mali vodni potencijal koji omogućava brzi influks vode (Woodstock, 1988; Obroucheva i Antipova, 1997, Liu i sar., 2005; Müller i sar., 2006). U ovoj fazi klijanja dolazi do reaktivacije enzima koji su preformirani u semenima prilikom njihovog sazrevanja (maturacije). Kod suvih semena *A. thaliana* je pokazano prisustvo velikog broja uskladištenih enzima koji su uključeni u značajne metaboličke puteve i do čije reaktivacije dolazi u fazi I klijanja (Gallardo i sar., 2001, Rajjou i sar., 2004, Fu i sar., 2005).

Pored uskladištenih enzima, kod semena *A. thaliana* u prvih 8 sati dolazi i do *de novo* sinteze proteina, pri čemu je najveća aktivnost *de novo* sintetisanih proteina primećena na početku faze II (u završetku faze II dolazi do izbijanja radikule). Pored antioksidativnih enzima, u procesu klijanja su veoma bitni i fitohormoni (ABA, GA, etilen). Da bi došlo do klijanja na samom početku faze II mora doći do snižavanja nivoa ABA. Kod *A. thaliana* okarakterisana su dva enzima (*cis*-epoksikarotenoid dioksigenaza i ABA 8'-hidroksilaza) koji su ključni za biosintezu i degradaciju ABA (Toh i sar., 2008). Kod iste vrste je primećeno da se GA nalazi uskladišten i u suvim semenima, kao i da dolazi do njegove *de novo* sinteze koja premašuje nivo ABA tri puta u fazi I i čak deset puta u fazi II (Ogawa i sar., 2003). Za vreme klijanja biosinteza GA je lokalizovana u radikuli, hipokotilu i u mikropilarnom endospermu (Weitbrecht i sar., 2011). Sa druge strane, povezana je uloga fitohormona i produkcije ROS tokom klijanja semena. Pokazano je da kod semena *L. sativum* GA stimuliše, dok ABA inhibira nakupljanje ROS.

Mnoga istraživanja pokazuju da je prelazak semena iz faze mirovanja u metabolički aktivan organizam povezan sa produkcijom ROS. Produkcija OH<sup>-</sup> i O<sub>2</sub><sup>-</sup> je pokazana kod različitih biljnih vrsta za vreme klijanja i rasta klijanaca (Bailly i sar., 2004, Oracz i sar., 2009). Takođe i u stadijumu dormancije dolazi do produkcije ROS, ali njihova uloga u ovoj fazi nije razjašnjena. Uloga ROS za vreme klijanja semena može biti: 1) indirektna, koja uključuje ćelijsku signalizaciju (Oracz i sar., 2009); ili 2) direktna, koja podrazumeva delovanje na ćelijske polimere (Müller i sar., 2009). Najnovija istraživanja Müller i sar. (2009) pokazuju direktnu ulogu OH<sup>-</sup> prilikom klijanja semena *Lepidium sativum* i *Arabidopsis thaliana*, i interakciju OH<sup>-</sup> sa polisaharidima ćelijskog zida, što dovodi do njegovog opuštanja i daljeg izduživanja radikule. Isti autori su takođe pokazali da tokom klijanja semena kresa pored produkcije OH<sup>-</sup> dolazi i do produkcije O<sub>2</sub><sup>-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok je uključivanje antioksidativnih enzima za vreme klijanja semena povezano sa signalnom ulogom ROS. Prema tome, ROS se proizvode i akumuliraju kao rezultat normalnih fizioloških procesa prilikom klijanja semena kresa. Međutim, prekomerno nakupljanje ROS u ćelijama i tkivima može biti rezultat dejstva različitih abiotičkih i biotičkih stresogenih faktora spoljašnje sredine, i može dovesti do promene opšteg stanja biljnog organizma koji se naziva oksidativni stres.

Tačan mehanizam delovanja alelohemikalija još uvek nije poznat, ali se zna da, kao i kod drugih vrsta stresa, alelopatske interakcije dovode do nekontrolisane produkcije i akumulacije ROS (Weir i sar., 2004). Delovanjem alelohemikalija (katehin) na semena *Arabidopsis thaliana* pokazano je značajno povećanje količine ROS u korenu. Semena slačice (*Sinapis alba*) na dejstvo alelohemikalija reaguju nakupljanjem velike količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, što dovodi do povećanja MDA koji je odgovoran za oštećenja ćelijskih membrana i uzrokuje isticanje elektrolita iz ćelije. Krajnji rezultat ovih procesa jeste gubitak vijabilnosti semena (Oracz i sar., 2007, Bogatek i sar., 2006). Delovanjem  $\alpha$ -pinena dolazi do nakupljanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u korenu *Cassia occidentalis*, *Amaranthus viridis*, *Triticum aestivum*, *Pisum sativum* i *Cicer arietinum* (Singh i sar., 2006a). Zunino i Zygadlo (2004) su pokazali da monoterpenoidi kao što su 1,8-cineol, timol, geraniol i kamfor indukuju oksidativni stres u korenu kukuruza produkcijom MDA. Etarsko ulje *N. meyeri* koje kao dominantno jedinjenje sadrži 83% 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,7 $\beta$ -nepetalaktona dovodi do povećanja lipidne peroksidacije i nakupljanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u semenima *Amaranthus retroflexus*, *Bromus danthoniae*, *Bromus intermedius*, *Chenopodium album*, *Cynodon dactylon*, *Lactuca serriola* i *Portulaca oleracea* (Multu i sar., 2011).

Da bi se makromolekuli zaštitili od oštećenja izazvanih oksidativnim stresom, u biljnom organizmu dolazi do aktivacije ćelijskih antioksidativnih sistema, što uključuje antioksidativne enzime. Pokazano je da dolazi do povećane ekspresije peroksidaza tokom kasnijih faza klijanja semena *Arabidopsis thaliana* i *Lepidium sativum*, a da se aktivnost enzima prvo javlja u kapi endosperma, a kasnije i u mikropilarnom endospermu i kapi radikule (Linkies et al., 2010a). Tri izoforme peroksidaza koje pokazuju tkivno-specifičnu ekspresiju identifikovane su u cDNA biblioteci kresa, (Linkies et al., 2010b). U našim eksperimentima je primećen porast aktivnosti POD tokom rasta klijanaca i može se pretpostaviti da je uzrok tome povećanje količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u klijanacima. Kod kontrolnih klijanaca i klijanaca kresa koji nisu bili izloženi dejstvu nepetalaktona primećena je značajna POD aktivnost već nakon 24 sata od početka imbibicije, i u tim prvim fazama klijanja ova aktivnost verovatno potiče od POD koje su preformirane i uskladištene u suvim semenima, ili od POD koje se sintetisu u ranim fazama klijanja, tokom probijanja radikule kroz endosperm. POD1 izoforma je uočena već prvog dana kod klijanaca koji nisu tretirani nepetalaktonom i može se pretpostaviti da upravo ova izoforma doprinosi ukupnoj aktivnosti peroksidaza u ovim početnim

fazama rasta klijanaca. Sve četiri detektovane izoforme ovog enzima kod pomenutih eksperimentalnih grupa klijanaca (POD1, POD2, POD3, POD4) pokazuju porast aktivnosti tokom klijanja, što verovatno predstavlja normalni obrazac klijanja semena ove vrste. Može se pretpostaviti da tokom ranih faza rastezanja klijanaca dolazi do povećane ekspresije i *de novo* sinteze POD izoformi, što u krajnjoj liniji dovodi do povećane ukupne aktivnosti peroksidaza. Usporena dinamika klijanja semena kresa na tretmanima nepetalaktonom praćena je odloženom pojavom aktivnosti POD ali i promenjenim profilom izoformi ovog enzima. Trećeg dana od početka imbibicije, kod semena izloženih *cis,trans*-nepetalaktonu, javljaju se dve izoforme POD, koje su označene kao POD2 i POD3, dok se na tretmanima *trans,cis*-nepetalaktonom aktivnost ove dve izoforme javlja tek četvrtog dana. Može se zaključiti da oba stereoizomera, a naročito *trans,cis*-nepetalakton odlažu pojavu aktivnosti POD, što je verovatno posledica usporene dinamike klijanja. Oba stereoizomera nepetalaktona bitno menjaju profil izoformi POD, tako da dolazi do potpune inhibicije aktivnosti POD1 i POD4. Može se pretpostaviti da se ove dve izoforme javljaju kao rezultat normalnih fizioloških procesa tokom klijanja semena kresa, a da je njihova aktivnost i verovatno ekspresija inhibirana dejstvom alelohemikalija. Nepetalaktoni kao alelohemikalije najverovatnije indukuju drugačije mehanizme koji regulišu eliminaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz ćelija i tkiva klijanaca kresa.

Postoje brojni radovi koji opisuju ulogu peroksidaza za vreme klijanja semena. *Miao* i sar. (2006) navode značajnu ulogu GPOD u uklanjanju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za vreme klijanja i rasta klijanaca *A. thaliana*. *Cakmak* i sar. (1992) navode da su imbibicija i klijanje semena *Triticum sativum* povezani sa kapacitetom ćelija da eliminišu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i da u prvom redu zavise od APOD. U našim eksperimentima je takođe pokazano da kod semena koja nisu bila izložena nepetalaktonima, peroksidaze predstavljaju jednu od prvih grupa enzima koja se javljaju da bi zaštitile ćelije od H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i verovatno da bi omogućile probijanje radikule kroz endosperm. U dosadašnjim istraživanjima vrlo retko je praćena dinamika klijanja semena pod dejstvom različitih stresnih uslova. U uslovima suše dolazi do povećanja aktivnosti POD u klijanjima *A. thaliana* (*Miao* i sar., 2006), dok delovanjem teških metala dolazi do stvaranja velike količine ROS i do porasta aktivnosti POD (*Drazkiewicz* i sar., 2004).



Isti autori su najizraženije povećanje aktivnosti APOD i GPOD opisali kod *A. thaliana* koji su izloženi UV zračenju. Kod klijanaca kresa koji su izloženi dejstvu teških metala (olovo) nije primećen porast aktivnosti POD (Ibrahim i Bafeel, 2011). Možemo zaključiti da u zavisnosti od vrste stresa, biljne vrste, a najviše od stadijuma razvića u kojem se biljka nalazi u trenutku delovanja stresogenih faktora, mogu postojati drugačiji mehanizmi zaštite makromolekula od ROS. Kod semena *Phaseolus mungo* u uslovima slanog stresa dolazi do smanjenja aktivnosti POD (Dush i Panda, 1991), dok kod semena *Sorghum vulgare* u uslovima osmotskog stresa dolazi do smanjene aktivnosti POD (Varadin i Rao, 2003). Može se pretpostaviti da specifičan odgovor semena prilikom delovanja različitih stresnih uslova, uključuje smanjenu aktivnost POD i najverovatnije smanjenu ekspresiju ovog enzima u semenima.

Katalaze predstavljaju grupu enzima koje katalizuju reakciju dismutacije vodonik peroksida do vode i kiseonika, i najčešće se sreću baš na mestima povećane produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, odnosno u peroksizomima, glioksizomima i citosolu (Tolbert i sar., 1980, Dat i sar., 2000, Garg i sar., 2009). Dučić i sar. (2004) su pokazali da prilikom klijanja semena *Chenopodium rubrum* dolazi do rane ekspresije CAT odmah po imbibiciji semena, što je povezano sa ulogom ovog enzima tokom izbijanja radikule. Pretpostavlja se da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji se nakuplja u semenima za vreme klijanja, predstavlja signalni molekul za aktivaciju CAT. Pokazano je da su CAT veoma bitne u procesu klijanja i tokom ranog razvića kod *A. thaliana* (Gallardo i sar., 2001). Pojava aktivnosti CAT u našim eksperimentima, kod klijanaca koji nisu bili izloženi dejstvu nepetalaktona, primećena je 48 sati nakon početka imbibicije, tj. nakon izbijanja radikule. U ovoj grupi semena primećen je porast aktivnosti CAT tokom rasteenja klijanaca, koji može biti posledica povećane količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Može se zaključiti da je u fazi klijanja semena *L. sativum*, koja uključuje probijanje radikule kroz endosperm, za eliminaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bitna aktivnost POD, a da je aktivnost CAT indukovana u početnim fazama rasteenja klijanaca. Rezultati ove disertacije ne ukazuju na način regulacije ekspresije i aktivnosti CAT tokom klijanja semena i rasteenja klijanaca kresa, ali će to biti predmet naših budućih istraživanja. Ono što je jasno jeste da je usporena dinamika klijanja semena kresa, koja su bila izložena nepetalaktonima, praćena odloženom pojavom aktivnosti CAT ali i promenjenim profilom izoformi ovog enzima.

Trećeg dana (nakon 72 sati) od početka imbibicije, kod semena izloženih *cis,trans*-nepetalaktonu, javljaju se dve izoforme CAT (CAT1 i CAT2), dok se na tretmanima *trans,cis*-nepetalaktonom aktivnost ove dve izoforme javlja tek četvrtog dana (nakon 96 sati). Može se izvesti zaključak da oba stereoizomera, a naročito *trans,cis*-nepetalakton, odlažu pojavu aktivnosti CAT, što je verovatno posledica usporene dinamike klijanja. Oba stereoizomera nepetalaktona menjaju profil izoformi CAT kod klijanaca kresa i dolazi do potpune inhibicije aktivnosti CAT3. Može se pretpostaviti da se ova izoforma javlja kao rezultat normalnih fizioloških procesa tokom klijanja semena kresa, a da je njena aktivnost i verovatno ekspresija inhibirana dejstvom alelohemikalija. Inhibicija aktivnosti i izmenjen profil izoformi CAT mogu dovesti do akumulacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ćelijama i tkivima, što može imati drastične posledice po osnovne fiziološke procese i samim tim uticati na rastenje i razviće klijanaca. U našim eksperimentima je primećena izmenjena morfologija klijanaca kresa koji su tretirani nepetalaktonima, a koji se odlikuju manjom dužinom nadzemnog dela i korena. Kod *A. thaliana* okarakterisana su tri gena za katalaze i pokazana je njihova visoka ekspresija u stresnim uslovima, naročito *cat2* i *cat3* gena koji se eksprimiraju u listovima (Frugoli i sar., 1996). U našim eksperimentima, pojava aktivnosti CAT poklapa se upravo sa periodom pojavljivanja prvih listova kod klijanaca, tj. 48 sati nakon početka imbibicije. U literaturi postoje podaci o razlikama u aktivnosti antioksidativnih enzima u zavisnosti od stadijuma razvića vrste izložene stresu. Pokazano je da kod semena *Phaseolus mungo* koja klijanju u uslovima slanog stresa dolazi do smanjenja aktivnosti CAT (Dash i Panda, 1991). Kod semena pšenice je u uslovima suše pokazan prvobitni pad aktivnosti CAT, a naknadno i porast aktivnosti ovog enzima (Zhang i Kirkham, 1994). Goel i sar. (2003) su pokazali da kod semena *Gossypium hirsutum* različiti stresni uslovi dovode do smanjene aktivnosti antioksidativnih enzima, uključujući i CAT (Goel i sar., 2003). Mutlu i sar. (2011) su pokazali da kod pet dana starih klijanaca korovskih vrsta kao što su *Amaranthus retroflexus*, *Bromus danthoniae*, *Chenopodium album*, *Cynodon dactylon*, *Lactuca serriola*, *Portulaca oleracea*, izloženih dejstvu etarskog ulja *N. meyer* koje sadrži *trans,cis*-nepetalakton (83%), dolazi do značajnog povećanja aktivnosti CAT u poređenju sa kontrolnom grupom. Povećanje aktivnosti CAT je pripisano povećanoj količini vodonik peroksida kod klijanaca izloženih dejstvu alelohemikalija.

Kod klijanaca *A. thaliana* je pokazano da prilikom povećanog zračenja i smanjene količine CO<sub>2</sub> dolazi do smanjene aktivnosti CAT u peroksizomima (Vandenabeele i sar., 2004). Može se pretpostaviti da je u ranim fazama razvića klijanaca kresa pod dejstvom alelohemikalija inhibirana aktivnost i verovatno ekspresija CAT.

Rano pojavljivanje aktivnosti POD i CAT kod klijanaca koji nisu rasli u atmosferi nepetalaktona može biti povezano sa nakupljanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u semenima koja klijaju i u najranijim fazama razvića klijanaca. Visoka produkcija i akumulacija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može dovesti do rane ekspresije POD i CAT. Pokazano je da u periodu rane imbibicije dolazi do produkcije vodonik peroksida kod semena soje (Puntarulo i sar., 1988, Puntarulo i sar., 1991, Gidrol i sar., 1994), kukuruza (Hite i sar., 1999), suncokreta (Bailly i sar., 2002), pšenice (Caliskan i sar., 1998), graška (Wojtyla i sar., 2006), paradajza (Morohashi i sar., 2002), itd. Wang i sar. (2009) su pokazali pojavu aktivnosti POD i CAT već prvog dana prilikom klijanja semena *Medicago sativa*, dok su Bailly i sar. (2004) pokazali porast aktivnosti CAT u periodu rane imbibicije semena *Heliantus annuus*, što je povezano sa činjenicom da u prvoj fazi klijanja semena, odmah po povećavanju sadržaja vlage, pored intenziviranog ćelijskog disanja dolazi i do sinteze proteina (Bewley, 1997). Pored toga, poznato je da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nastaje i tokom uklanjanja O<sub>2</sub><sup>-</sup> pod dejstvom SOD (Kliebenstein i sar., 1998).

U procesu klijanja semena mnogih biljnih vrsta detektovano je prisustvo ROS i antioksidativnih enzima, pa tako u toku imbibicije semena *Pisum sativum* dolazi do početnog nakupljanja O<sub>2</sub><sup>-</sup> i inicijalne pojave aktivnosti SOD, a u periodu izbijanja radikule i do sekundarnog povećanja količine superoksid radikala i povećane aktivnosti SOD (Kranter i sar., 2010). Kod semena *Triticum sativum* u toku imbibicije i klijanja u celom semenu kao i u izolovanom embrionu i endospermu primećena je aktivnost enzima kao što su: APOD, GPOD, CAT, SOD, GR, MDHAR, DHAR. Odmah po imbibiciji primećen je porast aktivnosti GPOD, CAT, SOD, i naročito APOD, pri čemu enzimi dostižu najveću aktivnost u periodu izbijanja radikule. Takođe, primećeno je opadanje aktivnosti enzima GR, MDHAR i DHAR (Cakmak i sar., 1993). Xi i sar. (2010) su pokazali da je ekspresija Mn-SOD u fazi imbibicije semena veoma bitna za proces klijanja semena *A. thaliana*. Isti autori takođe ukazuju na to da je ekspresija svih antioksidativnih gena *A. thaliana* specifična za semena i povećava toleranciju na

oksidativni stres za vreme klijanja i ranog rasta klijanaca. U našim eksperimentima je kod klijanaca *L. sativum* koji nisu tretirani nepetalaktonima primećena značajna aktivnost tri izoforme Mn-SOD (Mn-SOD1, Mn-SOD2 i Mn-SOD3) već posle 24 h od početka imbibicije. Uočena je i pojava aktivnosti tri izoforme Fe-SOD (Fe-SOD1, Fe-SOD2 i Fe-SOD3), dok je aktivnost dve izoforme CuZn-SOD (CuZn-SOD1 i CuZn-SOD2) detektovana trećeg dana. Rana pojava aktivnosti Mn-SOD i Fe-SOD kod ove grupe klijanaca može biti povezana sa normalnim obrascem klijanja semena *L. sativum*. Müller i sar. (2009) su kod semena *L. sativum* u periodu imbibicije detektovali  $O_2^{\cdot-}$  u radikuli i kapi endosperma, kao i aktivnost SOD nakon 8 sati od početka imbibicije. U toku imbibicije semena kresa dolazi do biosinteze fitohormona GA koji se smatra odgovornim za nakupljanje ROS u apoplastu, u prvom redu  $OH^{\cdot}$  i  $O_2^{\cdot-}$  (Müller i sar., 2009). Nakupljeni  $O_2^{\cdot-}$  predstavlja signalni molekul za ekspresiju SOD. Kod klijanaca kresa koji su bili izloženi delovanju nepetalaktona nije uočena značajna promena u ekspresiji i aktivnosti Mn-SOD izoformi kao ni promene u brojnosti izoformi ovih enzima. Prisustvo sve tri izoforme Mn-SOD je uočeno već nakon 24 h od početka imbibicije, pri čemu ekspresija Mn-SOD1 i Mn-SOD2 raste tokom vremena, dok ekspresija Mn-SOD3 opada. Možemo pretpostaviti da do zakasnele pojave aktivnosti Fe-SOD koje su lokalizovane u hloroplastima dolazi zbog odložene pojave prvih pravih listova i funkcionalnih hloroplasta kod klijanaca tretiranih nepetalaktonom. Prema tome, može se pretpostaviti da u prvim fazama razvića klijanaca (u heterotrofnoj fazi) Mn-SOD izoforme lokalizovane u mitohondrijama najviše doprinose eliminaciji  $O_2^{\cdot-}$  radikala, a zatim se u kasnijim fazama razvića (autotrofnoj fazi) uključuju CuZn-SOD i Fe-SOD izoforme. U slučaju CuZn-SOD, kod klijanaca kresa koji nisu bili izloženi dejstvu nepetalaktona, aktivnost obe izoforme (CuZn-SOD1 i CuZn-SOD2) se javlja trećeg dana, iako je prisustvo enzima detektovano već nakon 24 h od početka imbibicije. Kod klijanaca kresa koji su bili izloženi dejstvu nepetalaktona primećeno je da se aktivnost CuZn-SOD1 izoforme pojavljuje tek petog dana. Prisustvo enzima od najranijih faza razvića klijanaca i odložena pojava aktivnosti na tretmanima nepetalaktonom ukazuje na mogućnost postojanja regulacije aktivnosti CuZn-SOD na posttranslacionom nivou. Mutlu i sar. (2011) su pokazali da etarsko ulje *N. meyeri* kod pet dana starih klijanaca nekih korovskih vrsta dovodi do povećanja aktivnosti SOD.

Kubo i sar. (1999) su pokazali da različite vrste stresa dovode do indukcije donekle drugačijeg tipa odgovora *A. thaliana*, pa tako tokom slanog stresa dolazi do pojačane ekspresije Fe-SOD gena, u uslovima suše i niskih temperatura uočena je povećana aktivnost Mn-SOD, dok dejstvo herbicida izaziva povećanu aktivnost CuZn-SOD. Teški metali dovode do povećane aktivnosti SOD, kao u slučaju dejstva bakra kod *A. thaliana* (Drazkiewicz i sar., 2004), ili kadmijuma kod *L. sativum* (Gill i sar., 2012).

Demeke i sar. (2001) su pokazali da je aktivnost PPO u semenima stabilna i da povećanje vlage dovodi do blagog porasta aktivnosti PPO. U semenima kresa primećena je zastupljenost i aktivnost jedne PPO izoforme. Može se zaključiti da nepetalakton indukuje raniju ekspresiju PPO u klijancima kresa i na tretmanima ovom alelohemikalijom prisustvo PPO je zabeleženo već nakon 24 sata od početka imbibicije. Kod klijanaca koji nisu rasli u atmosferi nepetalaktona, pojava PPO je uočena trećeg dana od početka imbibicije. Relativna količina PPO raste tokom vremena kod svih eksperimentalnih grupa klijanaca. Generalno gledano, aktivnost PPO se uočava sa zakašnjenjem od 24 h u odnosu na trenutak pojave enzima, i značajno raste tokom vremena. Prema tome, postoji regulacija aktivnosti PPO na nivou ekspresije enzima tokom razvića klijanaca kresa. Može se pretpostaviti da u klijancima dolazi do ekspresije i *de novo* sinteze PPO koji oksiduju fenole i vrše regulaciju njihove koncentracije. *Cis,trans*-nepetalakton i naročito *trans,cis*-nepetalakton stimulišu ekspresiju PPO, a samim tim i aktivnost ovog enzima. Rezultati ukazuju na to da je stereohemija nepetalaktona bitna u regulaciji aktivnosti PPO, koja se odvija na nivou ekspresije (na transkripcionom ili translacionom nivou). Slično našim rezultatima, zapaženo je da se aktivnost PPO povećava tokom izlaganja biljaka različitim stresnim uslovima (Thipyapong i sar., 1997). U toku klijanja semena vrste *Glycine hispida* dolazi do povećanja količine  $\alpha$ -tokoferola (Simontacchi i sar., 1993, 2003, Yang i sar., 2001), flavonoida i fenola (Simontacchi i sar., 1993, Andarwulan i sar., 1999, Yang i sar., 2001), koji predstavljaju supstrat za delovanje PPO. Pokazano je da količina ukupnih fenola u klijancima kresa u našim eksperimentima zavisi od tretmana na kojima su klijanci gajeni. Na tretmanima *trans,cis*-nepetalaktonom uočena je značajno viša koncentracija fenola u klijancima kresa već prvog dana od početka imbibicije, u odnosu na klijance koji nisu bili izloženi dejstvu nepetalaktona. Jedan od uzroka pojave pojačane akumulacije fenolnih jedinjenja pod dejstvom nepetalaktona može biti upravo

inhibicija aktivnosti POD u ranim fazama razvića klijanaca kresa koja je uočena u našim eksperimentima. Naši rezultati pokazuju da POD u tom periodu dominantno doprinose eliminaciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i oksidaciji fenola kod netretiranih klijanaca, što nije primećeno pod dejstvom nepetalaktona. Drugo moguće objašnjenje za visoke koncentracije fenola u prisustvu nepetalaktona može biti inhibicija ekspresije i/ili aktivnosti PPO tokom faze klijanja semena. U svakom slučaju, porast koncentracije fenola do kog dolazi pod dejstvom alelohemikalije može biti signal za pojačanu ekspresiju PPO. S druge strane, upravo pojačana ekspresija PPO dovodi do ubrzanog opadanja količine ukupnih fenolnih jedinjenja tokom rastezanja i razvića klijanaca kresa u ovim uslovima. Opadanje količine fenola tokom vremena je izraženije kod klijanaca kresa gajenih u prisustvu *trans,cis*-nepetalaktona, što je rezultat upravo najveće aktivnosti PPO koja je zabeležena u ovoj eksperimentalnoj grupi klijanaca. Može se pretpostaviti da prilikom rasta klijanaca u atmosferi sa *cis,trans*- a pogotovo sa *trans,cis*-nepetalaktonom dolazi do narušavanja ćelijskih struktura što dovodi do oslobađanja PPO iz hloroplasta i njihovog fenolnog supstrata iz vakuola i do reakcije oksidacije fenola. Pokazano je da u stresnim uslovima kod *Lycopersicon esculentum* i *Citrullus lanatus* dolazi do povećanja količine fenolnih jedinjenja u biljkama (Rivero i sar., 2001). Ranija istraživanja pokazuju da abiotički stres kod mnogih biljnih vrsta dovodi do porasta aktivnosti PPO, kao u slučaju klijanaca *A. thaliana* izloženih dejstvu kadmijuma (Saffar i sar., 2009). Wang i sar. (2007) su pokazali da toplotni stres kod vrste *Brassica napus* dovodi do povećanja aktivnosti PPO. Ustanovljeno je da u semenima *Astragalus cicer* postoje dve forme PPO, jedna koja je preformirana i uskladištena u endospermu i druga *de novo* sintetisana koja je aktivna u klijancima (Sahbaz i sar., 2009). Pourcel i sar. (2005) su kod *A. thaliana* identifikovali TT10 gen u omotaču semena koji kodira protein zaslužan za oksidaciju fenolnih jedinjenja, i opisali oksidaciju flavonoid-proantocijanidina koji je polimer katehina i epikatehina pod dejstvom PPO.

U našim eksperimentima smo pokušali da utvrdimo koja su to fenolna jedinjenja najzastupljenija u klijancima kresa, i eventualno pokažemo promene njihovog kvantitativnog sastava u zavisnosti od dejstva nepetalaktona. Fenolna jedinjenja koja su karakteristična za vrste fam. *Brassicaceae* su sinapat i njegovi estri, čija moguća fiziološka uloga još uvek nije dovoljno poznata.

Tokom sazrevanja semena, iz sinap-aldehida nastaje sinapat a zatim sinapoil-glukoza (Nair i sar. 2000, 2002, Franke i sar., 2002), koja se zatim prevodi do sinapoil-holina. Sinapoil-holin se kao dominantno fenolno jedinjenje akumulira u semenima tokom njihovog sazrevanja i nalivanja. Za vreme klijanja, aktivnošću esteraza, dolazi do hidrolize sinapoil-holina (Tzagoloff, 1963, Nurmman i Strack, 1979, 1981, Strack, 1980, 1981). Uloga sinapoil-holina još uvek nije razjašnjena, ali se pretpostavlja da nastaje radi skladištenja holina koji se kasnije prilikom klijanja semena uključuje u biosintezu fosfatidilholina. U mladim klijanacima nastali sinapat se ponovo esterifikuje preko sinapoil-glukoze u sinapoil-malat. Kod klijanaca kresa, bez obzira na tretman, sa vremenom dolazi do opadanja količine sinap-aldehida. Ovakvi rezultati su u skladu sa činjenicom da je sinap-aldehid uskladišten u semenima i da njegove metaboličke transformacije počinju prilikom klijanja semena. Nije uočena značajna razlika u količini ovog jedinjenja između tretmana, pa se može pretpostaviti da dejstvo nepetalaktona nema uticaja na metabolizam ovog jedinjenja. Sinapoil-holin je u klijanacima kresa starim 1 dan zabeležen u značajnoj količini, naročito kod kontrolne grupe klijanaca. Tokom vremena, dolazi do opadanja količine sinapoil-holina u klijanacima, a opadanje je sporije kod klijanaca tretiranih nepetalaktonom. Može se pretpostaviti da aktivnošću enzima SCE dolazi do prevođenja sinapoil-holina do sinapata i holina. U našim analizama nije zabeležen sinapat u slobodnom obliku, što nije neuobičajeno, s obzirom da se ovo jedinjenje vrlo brzo uključuje u metaboličke procese i esterifikuje do sinapoil-glukoze. U saglasnosti sa tim je i porast količine sinapoil-glukoze u klijanacima tokom vremena, naročito kod kontrolne grupe klijanaca a potom i klijanaca ko-kultivisanih sa *N. nervosa*. Može se pretpostaviti da alelopatsko dejstvo nepetalaktona dovodi do usporene i smanjene ekspresije i aktivnosti enzima SGT, čijom aktivnošću se sinapat prevodi do sinapoil-glukoze. Količina sinapoil-malata, koji nastaje od sinapoil-glukoze u reakciji katalisanoj enzimom SMT, drastično opada tokom rastenja klijanaca kresa, naročito u slučajevima kada su klijaneci gajeni u ko-kulturama sa tri vrste roda *Nepeta*. Ovo su po malo iznenađujući rezultati, i moglo bi se očekivati da količina sinapoil-malata raste tokom vremena s obzirom da već posle trećeg dana dolazi do pojave pravih listova, koji preuzimaju funkciju fotosinteze. Mogućnosti su sledeće: ili se ovo jedinjenje u listovima klijanaca kresa odmah dalje uključuje u metaboličke procese te stoga nije detektovana njegova značajna količina, ili je inhibirana njegova sinteza.

Jedno od objašnjenja bi moglo da bude da se kod fotomiksotrofnih biljaka u uslovima *in vitro*, koje najveći deo energije i ugljenika za odvijanje primarnog metabolizma obezbeđuju asimilacijom šećera iz hranljive podloge, ne sintetiše dovoljna količina malata, te da se on ne usmerava ka sintezi sinapoil-malata, već se direktno uključuje u Kalvinov ciklus koji predstavlja proces od esencijalnog značaja za rastenje i razviće biljaka. U opisanim uslovima može doći, ili do inhibicije ekspresije i aktivnosti enzima SMT koji katališe reakciju prevođenja sinapoil-glukoze do sinapoil-malata, ili je aktivnost ovog enzima inhibirana usled nedovoljne količine supstrata, tj. malata. Ovo su samo pretpostavke koje treba potvrditi daljim istraživanjima. Očigledno je da alelopatske interakcije generišu odgovor biljaka koji se ogleda kroz čitav niz promena u primarnom i sekundarnom metabolizmu semena i klijanaca kresa. Metaboličke transformacije sinapata koje se odigravaju tokom klijanja semena kresa, očigledno su direktno ili indirektno regulisane alelohemikalijama. Generalno je primećeno da izlaganje semena i klijanaca kresa dejstvu *trans,cis*- i *cis,trans*-nepetalaktona dovodi do poremećenog fluksa u biosintetskom putu sinapata, što izaziva variranje u količini sinapoil-glukoze, sinapoil-holina i sinapoil-malata, i može dalje imati fatalne posledice na rastenje i razviće biljaka i njihov odbrambeni odgovor na različite vidove abiotičkih i biotičkih stresova. Indirektno dejstvo nepetalaktona na metabolizam sinapata može takođe biti posledica usporene dinamike klijanja ili dejstva ove alelohemikalije na druge metaboličke procese. Pretpostavka je da se direktni efekat alelopatskih interakcija može ogledati kroz regulaciju ekspresije i aktivnosti enzima kao što su SALDH, SGT, SCT i SCE, koji su uključeni u metabolizam sinapata. Takođe, ovakve promene u sadržaju sinapata mogu direktno uzrokovati i promene u aktivnosti nekih antioksidativnih enzima kao što su PPO. Naši budući eksperimenti su usmereni ka razjašnjavanju moguće uloge nekih od pomenutih enzima u alelopatskim interakcijama. *Hause i sar. (2002)* su pokazali da se enzim SMT nalazi u svim biljnim organima izuzev u semenima i mladim klijanima. Isti autori su takođe pokazali lokalizaciju enzima u centralnoj vakuoli mezofila kao i u epidermalnim ćelijama lista. Možemo pretpostaviti da je u našim eksperimentima manja količina sinapoil-malata na tretmanu sa vrstama iz roda *Nepeta* posledica smanjene ekspresije i aktivnosti ovog enzima usled nedovoljne diferencijacije tkiva.



Kod *A. thaliana* okarakterisani su geni (*At1g28640*, *At1g28650*, *At1g28660*, i *At1g28670*) koji kodiraju katalitički aktivan SCE, pri čemu je pokazano da, kada u semenima dođe do ekspresije ovih gena, dolazi do dramatičnog smanjenja količine sinapoil-holina (Clauß i sar., 2008). U našim rezultatima je primećeno značajno smanjenje sinapoil-holina samo kod kontrolne grupe, dok je kod semena koja su bila izložena dejstvu nepetalaktona primećen znatno sporiji pad količine sinapoil-holina što može biti rezultat smanjene ekspresije pomenutih gena. Dixon i Pavla (1995) su pokazali da različiti stresni uslovi dovode do intenziviranja fenilpropanoidnog metabolizma koji je odgovoran za sintezu estara sinapata. Elguera i Barrientos (2013) su pokazali da teški metali ne dovode do značajne promene količine sinapinske kiseline kod klijanaca *L. sativum*. Poznato je da sinapoil-malat ima zaštitnu ulogu u listovima od UV zračenja, a izlaganjem *A. thaliana* ovoj vrsti stresa dolazi do povećanja količine flavonoida i sinapoil-malata u listovima (Frohnmeyer i Staiger, 2003). Kod mnogih vrsta fam. *Brassicaceae* je pokazano da prilikom napada patogenih mikroorganizama dolazi do povećanja količine sinapoil-malata (Jahangir i sar., 2009).

Na fiziološkom i molekularnom nivou postoje različiti mehanizmi dejstva alelohemikalija. Pokazano je da alelohemikalije kao što su juglon (*Juglans nigra*) i sorgoleon (*Sorghum bicolor*) dovode do inhibicije fotosinteze (Einhellig i sar., 1992, Hejl i sar., 1992, Jose i sar., 1998). Abrachim i sar. (2000, 2003) su pokazali da  $\alpha$ -pinen (*Salvia leucophylla*, *Citrus aurantium*, *Calamintha ashei*, *Conradina canescens*) dovodi do inhibicije disanja. Neke alelohemikalije kao što je npr. katehin mogu dovesti do ćelijske smrti u meristemu korena (Prithiviraj i sar., 2006). Pokazano je da stereoizomeri jednog jedinjenja pokazuju različite mehanizme delovanja u ostvarivanju alelopatskih interakcija, pa tako 1,8-cineol inhibira deobu ćelija dok 1,4-cineol dovodi do inhibicije određenih enzima kao što je npr. asparagin sintaza (Duke i sar., 2005). Oracz i sar. (2011) su pokazali da alelohemikalije vrste *Myrica gale* zaustavljaju proces klijanja semena *L. sativum*. Alelohemikalije, kao što je npr. mirigalon mogu delovati direktno na 13-hidroksilovani biosintetski put u radikuli i kapi endosperma semena *L. sativum* gde se sintetišu GA<sub>1</sub> i GA<sub>4</sub>. GA<sub>4</sub> ima veliku ulogu prilikom klijanja semena *A. thaliana* i *L. sativum* s obzirom da stimuliše nakupljanje O<sub>2</sub><sup>-</sup> i OH što je povezano sa izduživanjem radikule i probijanjem endosperma (Ogawa i sar., 2003).

Pokazano je da alelohemikalija mirigalon dovodi do smanjene sinteze GA<sub>4</sub> u radikuli, i samim tim do smanjene produkcije i nakupljanja ROS u semenima, što dovodi do inhibicije klijanja. Na osnovu poznate fiziologije klijanja semena *L. sativum* kao i poznate fiziologije i morfologije rasta i razvića klijanaca može se pretpostaviti da *cis,trans*- i *trans,cis*-nepetalakton mogu delovati na semena tako što sprečavaju reaktivaciju enzima koji su uskladišteni u semenima ili dovode do izostanka *de novo* sinteze proteina na početku faze II prilikom klijanja semena. Takođe možemo pretpostaviti da na nivou fitohormona dolazi do izostanka ekspresije gena koji su odgovorni za degradaciju ABA ili izostanka ekspresije gena koji su odgovorni za biosintezu GA, pri čemu ne dolazi do narušavanja inhibitornog odnosa ABA/GA koji se održava za sve vreme dormancije semena. Kako je GA odgovoran za nakupljanje ROS u semenima tokom klijanja u prvom redu O<sub>2</sub><sup>-</sup> i OH<sup>-</sup>, možemo pretpostaviti da izostaje signalna uloga ROS u ekspresiji antioksidativnih enzima koji su neophodni za klijanje. Kako je u našim eksperimentima primećena izmenjena morfologija klijanaca kresa na tretmanima nepetalaktonom, kao i odložena i smanjena aktivnost antioksidativnih enzima (POD, CAT i SOD, može se pretpostaviti da usled smanjene aktivnosti antioksidativnih enzima dolazi do nakupljanja ROS u ćelijama i tkivima klijanaca, što može imati negativne posledice na rastenje i razviće klijanaca.

Biološki aktivna jedinjenja - produkti sekundarnog metabolizma se sastoje od osnovnog ugljovodoničnog niza koji je u suštini hemijski prilično inertan, dok supstituisane grupe i njihov položaj daju reaktivnost datom jedinjenju. Stereoizomeri su jedinjenja koja imaju istu molekulsku formulu ali je pokazano da zbog stereohemije imaju različite funkcionalne grupe, različite hemijske i fizičke osobine, drugačije kiselo-bazne osobine, pokazuju drugačiju sposobnost vezivanja za ciljna mesta, drugačiju jonizaciju, kao i različitu termostabilnost (*Lemke i sar, 2003, Cairns, 2002, Graham, 2009*). Pokazano je da su receptori za sintetičke lekove hiralni i da im odgovara samo jedan specifičan stereoizomer aktivnog jedinjenja. Primer je *cis*-ketoprofen koji ublažuje migrenozne bolove, dok je *trans*-ketoprofen neaktivan. Interesantno je da orijentacija samo jedne hemijske veze dovodi do promene ukusa jedinjenja, kao u slučaju *cis,cis*-aspartama koji je slatkog ukusa dok je *trans,trans*-aspartam gorak. Istraživanja sekundarnih metabolita biljaka pokazuju da stereohemija aktivnog jedinjenja ima značajnu ulogu u ostvarivanju bioloških aktivnosti.

Pokazano je da *trans,cis*-stereoizomer nepetalaktona pokazuje jače toksično dejstvo i jaču repelentnu aktivnost na bubašvabe od *cis,trans*-stereoizomera nepetalaktona (Gkinis i sar., 2003, Peterson i Coats, 2001, Peterson i sar., 2002). Birkett i Pickett (2003) su pokazali da je *trans,cis*-nepetalakton jači feromon pčela od *cis,trans*-nepetalaktona. Romagni i sar. (1999) su pokazali da 1,4-cineol ima jače inhibitorno dejstvo na rast klijanaca *Echinochloa crusgalli* od 1,8-cineola. Pomenuti autori su opisali da 1,4-cineol dovodi do inhibicije rasta korena i nadzemnog dela, što je praćeno izmenjenim intezitetom fotosinteze i formiranjem abnormalnih listova pomenute korovske vrste, dok 1,8-cineol inhibira samo rast korena. Analози cineola poseduju istu molekulsku težinu i istu molekulsku formulu a razlikuju se u položaju samo jedne hemijske veze, što uslovljava minimalne promene u strukturnoj formuli, koje međutim značajno utiču na konformaciju cineola. Romagni i sar. (1999) su slabije dejstvo 1,8-cineola pripisali neznatno manjoj stabilnosti 1,8- konformacije (neznatno veća energija) kao i drugačijoj prostornoj orijentaciji.

Dambolena i sar. (2010) su primetili jače toksično dejstvo (+)-mentola i (-)-mentola na *Fusarium verticillioides* u poređenju sa (+)-izomentolom i (-)-neomentolom, što je pripisano lipofilnom karakteru (+)-mentola i (-)-mentola. Međutim, jače antitoksično dejstvo (+)-mentola od (-)-mentola isti autori su pripisali specifičnom stereohemijskom vezivanju jedinjenja za citoplazmatičnu membranu gljiva. Poznato je da hiralnost komponenti biomembrana ima značajnu ulogu u organizaciji i funkcionisanju samih membrana. Hiralna organizacija dovodi do toga da samo hiralni molekuli mogu uzajamno delovati sa membranama (Bonbelli i sar., 2008). Stereospecifična interakcija monoterpenoida sa npr. citoplazmatičnom membranom *Bacillus cereus* dovodi do značajnog smanjenja ukupne količine ATP u ćeliji, što je povezano sa promenom membranskog potencijala. Smanjenjem membranskog potencijala dolazi do povećane permeabilnosti za  $H^+$  i  $K^+$  i do narušavanja jonskog gradijenta, koji može dovesti do oštećenja osnovnih esencijalnih procesa i do smrti ćelija.

U našim eksperimentima, u testovima za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti i alelopatskog potencijala, pokazano je da stereohemija nepetalaktona značajno određuje njegovu biološku aktivnost. U oba slučaja jače dejstvo ostvaruje *trans,cis*- stereoizomer

nepetalaktona. Nepetalakton se sastoji od nepolarnog ciklopentanoidnog prstena i cikličnog estra, kao i supstituisanih grupa. Nepetalaktoni poseduju tri hiralna centra, pa mogu postojati u obliku osam stereoizomera, četiri diastereoizomera i njihovih odgovarajućih enantiomera. Na osnovu ranijih istraživanja na drugim analognim jedinjenjima, možemo pretpostaviti da veća aktivnost *trans,cis*-nepetalaktona potiče od veće stabilnosti *trans,cis*- konformacije. Moguće je da pomenuti stereoizomer, zbog stereospecifičnog vezivanja, lakše interaguje sa ćelijskim membranama, što neminovno dovodi do mnogih promena na samoj membrani. Može doći do promena membranskog potencijala, kao i povećanja permeabilnosti plazmamembrane što može usloviti narušavanje jonskog gradijenta i smrti ćelije. Rasvetljavanje tačnog mehanizma dejstva nepetalaktona na nivou plazmamembrane i aktivacije signala koji indukuju odbrambeni odgovor je predmet naših budućih istraživanja.

## 6. ZAKLJUČCI

Osnovni zaključci istraživanja izvedenih u okviru ovog rada su:

- ☞ Fitohemijska karakterizacija tri vrste roda *Nepeta* gajenih *in vitro*, omogućila je identifikaciju i kvantifikaciju glavnih grupa sekundarnih metabolita (terpenoida i fenolnih jedinjenja) koji se u ovim uslovima produkuju. Dominantno isparljivo jedinjenje iz grupe terpenoida je monoterpenski lakton nepetalakton, pri čemu je kod vrste *N. rtanjensis* većinski prisutan *tran,cis*- izomer a kod *N. sibirica* *cis,trans*-izomer nepetalaktona. Kod vrste *N. nervosa* nepetalakton je detektovan samo u tragovima. Kod ispitivanih vrsta, ruzmarinska kiselina se javlja kao dominantno fenolno jedinjenje, dok su kod *N. rtanjensis* i *N. sibirica* identifikovani i derivati ruzmarinske kiseline.
- ☞ Opisana *UHPLC/DAD/±HESI-MS/MS* metoda za brzu, pouzdanu i efikasnu identifikaciju nepetalaktona i fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima, može imati veliki značaj i široku primenu u hemotaksonomiji i populacionoj genetici. Velika kvalitativna i kvantitativna varijabilnost ove dve grupe sekundarnih metabolita kod vrsta roda *Nepeta* kvalifikuje ih kao dobar marker sistem za procenu hemijskog diverziteta u okviru roda.
- ☞ Metanolni ekstrakti *N. rtanjensis*, *N. sibirica* i naročito *N. nervosa*, pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost, koja se pripisuje fenolnim jedinjenjima, a na prvom mestu ruzmarinskoj kiselini. Nepetalakton ne utiče značajno na antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata, ali postoji mogućnost antagonističkog delovanja između fenolnih kiselina i nepetalaktona.
- ☞ Najveću antimikrobnu aktivnost pokazuje metanolni ekstrakt *N. rtanjensis*, sledi *N. sibirica*, i na kraju *N. nervosa*. Monoterpenoidna jedinjenja (nepetalaktoni) značajno doprinose antibakterijskoj i antigljivičnoj aktivnosti. Stereohemija nepetalaktona bitno određuje njegovu antimikrobnu aktivnost, pri čemu je *tran,cis*- izomer aktivniji od *cis,trans*-izomera. Fenolna jedinjenja takođe imaju značajnog udela u antimikrobnoj aktivnosti metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta.

Ekstrakti ispitivanih vrsta se mogu preporučiti u prevenciji i u lečenju bolesti i zaraza izazvanih patogenim mikroorganizmima kao što su *Escherishia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus* i *A. fumigatus*.

- ☞ Potvrđeno je alelopatsko dejstvo *N. ratanjensis* i *N. sibirica*, koje se pripisuje nepetalaktonu. Postoji pozitivna korelacija između alelopatskog efekta i koncentracije nepetalaktona. Stereohemija nepetalaktona značajno određuje njegov alelopatski potencijal, pri čemu *trans,cis*- izomer pokazuje veću aktivnost od *cis,trans*-izomera. Alelopatsko dejstvo nepetalaktona se ogleda kroz usporenu dinamiku klijanja semena *Lepidium sativum* L., ali i kroz efekat na biohemijske procese koji su posledica poremećenog antioksidativnog sistema biljaka.
- ☞ Alelopatsko dejstvo nepetalaktona, a naročito njegovog *trans,cis*-izomera, dovodi do promena u antioksidativnom sistemu klijanaca kresa narušavanjem normalnih modela ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su SOD (Mn-SOD, Fe-SOD i CuZn-SOD). Nije uočena značajna promena ekspresije i aktivnosti Mn-SOD i CuZn-SOD izoformi u zavisnosti od delovanja nepetalaktona, kao ni promene u brojnosti izoformi ovih enzima. Usporena dinamika klijanja semena je praćena usporenim razvojnim procesom klijanaca, odloženom pojavom prvih pravih listova i funkcionalnih hloroplasta, što je verovatno uzrok zakasnele pojave aktivnosti Fe-SOD izoformi lokalizovanih u ovim organelama. Može se pretpostaviti da u prvim fazama razvića klijanaca (u heterotrofnoj fazi) Mn-SOD izoforme lokalizovane u mitohondrijama najviše doprinose eliminaciji  $O_2^{\cdot -}$  radikala, a zatim se u kasnijim fazama razvića (autotrofnoj fazi) uključuju CuZn-SOD i Fe-SOD izoforme.
- ☞ Normalni program rastenja i razvića klijanaca kresa podrazumeva uključivanje CAT u proces eliminacije  $H_2O_2$ , njegovom razgradnjom do kiseonika i vode, drugog dana od početka imbibicije. Aktivnost CAT vremenom raste. Odložena pojava i inhibicija aktivnosti CAT pod dejstvom nepetalaktona, naročito njegovog *trans,cis*-izomera, može biti posledica usporene dinamike klijanja semena, ali može biti i regulisana na nivou ekspresije ili aktivnosti enzima direktnim dejstvom alelohemikalije.

Inhibicija aktivnosti i izmenjen profil izoformi CAT mogu rezultovati akumulacijom  $H_2O_2$  u ćelijama i tkivima, što može imati drastične posledice po esencijalne fiziološke procese i samim tim na rastenje i razviće klijanaca.

- ☞ Peroksidaze (POD1) kod netretiranih klijanaca regulišu nivo  $H_2O_2$  u ćelijama već u najranijim fazama razvića. Vremenom ukupna aktivnost POD raste i dolazi do pojave aktivnosti novih izoformi (POD2, POD3 i POD4). Pod dejstvom nepetalaktona, izostaje aktivnost POD1 u najranijim fazama razvića, kao i aktivnost POD4. Odložena je i pojava aktivnosti POD2 i POD3 izoformi. Rezultat ovakvih dešavanja može biti akumulacija  $H_2O_2$  u prvim danima razvića klijanaca i akumulacija fenola usled izostanka aktivnosti vakuolarne POD koja redukuje  $H_2O_2$  tako što koristi fenolna jedinjenja kao primarne elektron donore. Modifikovani profil izoformi POD, kao i izmenjeni model aktivnosti POD pod dejstvom nepetalaktona, može biti posledica usporene dinamike klijanja semena, ali vrlo verovatno postoji nepetalakton-specifična regulacija na nivou ekspresije i aktivnosti ovih enzima.
- ☞ *Trans,cis*-nepetalakton dovodi do povećanog sadržaja ukupnih fenola u prvim fazama rasteња i razvića klijanaca kresa, što je praćeno ranijom indukcijom ekspresije i povećanom aktivnošću PPO. Rezultat je ubrzano opadanje sadržaja fenolnih jedinjenja tokom vremena do nivoa specifičnog za netretirane klijance kresa. PPO predstavljaju bitnu komponentu odbrambenog mehanizma klijanaca kresa na alelopatski potencijal nepetalaktona i preuzimaju glavnu funkciju oksidacije fenola i regulacije njihove koncentracije u ranim fazama rasteња i razvića, kada dolazi do izostanka aktivnosti POD.
- ☞ Promene u metaboličkim transformacijama sinapata, koje se odigravaju pod dejstvom nepetalaktona, mogu rezultovati čitavim nizom promena u primarnom i sekundarnom metabolizmu semena i klijanaca kresa, i na taj način poremetiti osnovne modele rasteња i razvića biljaka i uticati na njihov antioksidativni sistem.

- ☞ Alelopatsko dejstvo nepetalaktona pokazano je u slučaju poljoprivrednih kultura kao što su *Lactuca sativa* L. sorta Majska kraljica, *Lotus corniculatus* L. sorta Bokor, *Brassica napus* L., i korovskih vrsta poput *Stellaria media* (L.) Vill., *Rumex crispus* L., i *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ekotip Kolumbija. Iako se radi o preliminarnim istraživanjima, ona ukazuju na visoki potencijal korišćenja etarskog ulja *N. rtanjensis* u poljoprivrednoj praksi, kao bioherbicida za kontrolu i suzbijanje korovskih vrsta.



## LITERATURA

1. 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**: 611-624.
2. Abraham, D., Francischini, A.C., Pergo, E.M., Kelmer-Bracht, A.M., Ishii-Iwamoto, E.L. (2003). Effects of alpha-pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**: 985-991.
3. Adiguzel, A., Ozer, H., Kilic, H., Cetin, B. (2007). Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* on foodborne bacteria and fungi. *Czech Journal of Food Science*, **25**: 81-89.
4. Adiguzel, A., Ozer, H., Sokmen, M., Gulluce, M., Sokman, A., Kilic, H., Sahin, F., Baris, O. (2009). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Nepeta cataria*. *Polish Journal of Microbiology*, **58(1)**: 69-76.
5. Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, **105**: 121-126.
6. Agata, N, Ohta, M, Yokoyama, K. (2002). Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology*, **71(1)**: 23–27.
7. Aharoni, A., Jongsma, M.A., Bouwmeester, H.J. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science*, **10(12)**: 594-602.
8. Ahmed, A.A., Husaam, E.H. Hegazy, M.F., Tzakou, O., Couladis, M., El-Hamed, A., Mohamed, H., Mohamed A., Pare, A.P. (2006). Argolic acid A and argolic methyl ester B, two new cyclopentano-monoterpenes diol from *Nepeta argolica*. *Natural Product Communications*, **1**: 523-526.
9. Alcher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1331-1341.

10. Alim, A., Goze, I., Cetin, A., Atas, A.D., Cetinus, S.A., Vural, N. (2009). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Nepeta nuda* L. subsp. *albiflora* (Boiss.). *African Journal of Microbiology Research*, **3(8)**: 463-467.
11. 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**: 1331-1341.
12. Andarwulan, N., Fardiaz, D., Wattimena, G.A., Shetty, K. (1999). Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Reinw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 3158-3163.
13. Angelini, L.G., Capranese, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Macchia, M., Flamini, G. (2003). Essential oils from Mediterranean *Lamiaceae* as weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 6158-6164.
14. Aquino-Bolaños, E.N., Mercado-Silva, E. (2004). Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. *Postharvest Biology and Technology*, **33**: 275-283.
15. Arora, R.B., Roy, S., Qadri, I.Z., Kesar, D.K. (1985). Long term follow up of patients of hypercholesteremia and hyperlipidemia with herbal polypharmaceutical-lipotab. *Hamdard National Foundation Monograph*, 175-184.
16. Aruoma, O.L. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**: 199-212.
17. Asard, H., May, J.M., Smirno, V.N. (2004). Vitamin C: Functions and biochemistry in animals and plants. Garland Sciences/BIOS Scientific Publishers, Oxon, New York.
18. Aydin, S., Beis, R., Ozturk, Y., Husnu, K., Baser, K.H.C. (1998). Nepetalactone: A new opioid analgesic from *Nepeta cesarea* Boiss. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **50**: 813-817.
19. Aydin, S., Demir, T., Öztürk, Y., Hüsnu, K. Başer, C. (1999). Analgesic activity of *Nepeta italica* L. *Phytotherapy Research*, **13**: 20-23.

20. Azza, S., Lyoussi, B., Miguel, M.G. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, **16**: 7672-7690.
21. Badisa, R.B., Tzakou, O., Couladis, M., Pilarinou, E. (2003). Cytotoxic activities of some Greek *Labiatae* herbs. *Phytotherapy Research*, **17**: 472-476.
22. Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, **14**: 93-107.
23. Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., Côme, D. (2000). Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Science Research*, **10**: 35-42.
24. Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, **331(10)**: 806-814.
25. Bailly, C., Leszczynska B., Côme R., Corbineau, F. (2002). Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Science Research*, **12**: 47-55.
26. Bannister, W.H., Bannister, J.V., Barra, D., Bond, J., Bossa, F. (1991). Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radical Research Communications*, **12-13**: 349-361.
27. Barro, D., Schinina, M.E., Bossa, F., Puget, K., Durosay, P. (1990). A tetrameric iron superoxide dismutase from the eukaryote *Tetrahymena pyridornis*. *Journal of Biological Chemistry*, **265**: 17680-17687.
28. Baser, K.H.C., Demirci, B. (2007). Chemistry of essential oils, In: Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing, Sustainability. (Berger, R.M. Ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 648.
29. Baser, K.H.C., Kirimer, N., Kurkcuoglu, M., Demirci, M. (2000). Essential oils of *Nepeta* specie growing in Turkey. *Chemistry of natural compounds*, **36 (4)**: 356-359.
30. Basera, K.H.C., Özeka, T., Bemircia, B., Tümenb, G. (2001). Composition of the essential oil of *Nepeta betonicifolia* C.A. Meyer from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, **13(1)**: 35-36.

31. Bates, R.B. Sigel, C.W. (1963). Terpenoids, *cis-trans* and *trans-cis* nepetalactones. *Experientia*, **19**: 564-565.
32. Bates, R.B., Eisenbraun, E.J., McElvain, S.M. (1958). The methylcyclopentane-1, 2-dicarboxylic acids and the configurations of the nepetic acids. *Journal of the American Chemical Society*, **80**: 3420-3428.
33. Bath, R., Rai, R.V., Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safet*, **9(1)**: 57-81.
34. Batish, D.R., Kohli, R.K., Singh, H.P., Saxena, D.B. (1997). Studies on herbicidal activity of parthenin, a constituent of *Parthenium hysterophorus* towards billgoat weed (*Ageratum conyzoides*). *Current Science*, **73**: 369-371.
35. Bauer, J., Gareis, M., Bott, A., Gedek, B. (1989). Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, **27(1)**: 45-50.
36. Beauchamp, C., Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44(1)**: 276-287.
37. Bedoya, L.M., Palomino, S.S., Abad, M.J., Bermejo, P., Alcami, J. (2002). Screening of selected plant extracts for *in vitro* inhibitory activity on human immunodeficiency virus. *Phytotherapy Research*, **16**: 550-554.
38. Bellesia, F., Grandi, R., Pagnoni, U.M., Pinetti, A., Trave, R. (1984). Biosynthesis of nepetalactone in *Nepeta cataria*. *Phytochemistry*, **23(1)**: 83-87.
39. Bellesia, F., Pagnoni, U.M, Trave, R., Andretti, G.D., Bocelli, G., Sgarabotto, P. (1979). Synthesis and molecular structures of (1S)-*cis*, *cis*-iridolactones. *Journal of the chemical society. Perkin transactions*, **2(10)**: 1341-1346.
40. Belongia, E.A., McDonald, K.L., Parham, G.L., White, K.E., Korlath, J.A., Lobato, M.N., Strand, S.M., Casale, K.A. Osterholm, M.T. (1991). An outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *The Journal of Infectious Diseases*, **164 (2)**: 338-343.
41. Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Riob, J.A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food chemistry*, **68(4)**: 457-462.

42. Benzie, I.F F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**: 70-76.
43. Bernier, U.R., Furman, K.D., Kline D.L., Allan, S.A., Barnard, D.R. (2005). Comparison of contact and spatial repellency of catnip oil and N, N-diethyl-3-methylbenzamide (deet) against mosquito. *Journal of Medical Entomology*, **42**: 306-311.
44. Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., Legrand, M. (2007). Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis effects auxin transport and plant growth. *Plant Cell*, **19**: 148-162.
45. Bewley, J.D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, **9**: 1055-1061.
46. Beyer, W.F., Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, **161(2)**: 559 – 566.
47. Bhatia, S., Shukla, R., Madhu, S.V., Gambhir, J.K., Prabhu, K.M. (2003). Antioxidant status, lipid peroxidation and NO end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clinical Biochemistry*, **36**: 557-562.
48. Birkett, M.A., Bruce, T., Pickett, J.A. (2010). Repellent activity of *Nepeta grandiflora* and *Nepeta clarkei* (*Lamiaceae*) against the cereal aphid, *Sitobion avenae* (*Homoptera: Aphididae*). *Phytochemistry Letters*, **3(3)**:139-142.
49. Birkett, M.A., Pickett, J.A. (2003). Aphid sex pheromones: from discovery to commercial production. *Phytochemistry*, **62(5)**: 651-656.
50. Bisht, D.S., Padalia, R.C., Singh, L., Pande, V., Lal, P., Mathela, C.S. (2010). Constituents and antimicrobial activity of the essential oils of six Himalayan *Nepeta* species. **75**: 739-747.
51. Blatter, E. (1928). Beautiful flowers of Kashmir, vol II, John Bale, Sons and Danielsson Limited Publishers, London.
52. Bogatek, R., Gniazdowska, A., Zakrzewska, W., Oracz, K., Gawronski, S.W. (2006). Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. *Biologia Plantarum*, **50**:156-158.

53. Bombelli, C., Borocci, S., Cruciani, O., Mancini, G., Monti D., Segre, A.L., Sorrenti A., Venanzi M. (2008). Chiral recognition of dipeptides in bio-membrane models: the role of amphiphile hydrophobic chains. *Tetrahedron: Asymmetry*, **19(1)**: 124-130.
54. Booth, C. (1971). Fungal culture media. In: Methods in microbiology (Norris, J.R., Ribbons, D.W., Eds.). London & New York: Academic Press. pp: 49-94.
55. Boros, B., Jakabova, S., Dornyeia, A., Horvathd, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felingera, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of chromatography A*, **1217**: 7972-7980.
56. Böttcher, C., von Roepenack-Lahaye, E., Schmidt, J., Schmotz, C., Neumann S., Scheel, D., Clemens, S. (2008). Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **147**: 2107-2120.
57. Bottini, A.T., Dev, V., Garfagnoli, D.J., Lohani, H., Mathela C.S., Pant, A.K. (1987). Isolation and crystal structure of a novel dichemical bis-monoterpenoid from *Cymbopogon martinii*. *Phytochemistry*, **26(8)**: 2301-2302.
58. Bottini, A.T., Dev, V., Shah, G.C., Mathela, C.S., Melkani, A.B., Strum, N.S. (1992). Cyclopentano-monoterpene enol acetates from *Nepeta leucophylla*. *Phytochemistry*, **35**: 1653-1657.
59. Bourel, C., Perineau, F., Michel, G., Bessire, J.M. (1993). Catnip (*Nepeta cataria* L.) Essential oil: analysis of chemical constituents, bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential oil Research*, **5**: 159-167.
60. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, **161(5)**: 839-851.
61. Bouteau, H.E.M., Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, **3(3)**: 175-182.
62. Bozari, S., Agar, G., Aksakal, O., Erturk, F.A., Yanmis, D. (2012). Determination of chemical composition and genotoxic effects of essential oil obtained from *Nepeta nuda* on *Zea mays* seedlings. *Toxicology and Industrial Health*, DOI: 10.1177/0748233711433939.

63. Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principal of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 24-54.
64. Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Manios, Y., Roxborough, H.E., Schuch, W., Sheehy, P.J.A., Wagnern, K.H. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 913-938.
65. Brand-Williams, W.W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie*, **28**: 25-30.
66. Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C.A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, **330(3)**: 1173-1178.
67. Buckingham, J. (1994). Dictionary of natural products. Champan and Hall, London.
68. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94(3)**: 233-253.
69. Cairns, D. (2002). Essentials of Pharmaceutical Chemistry. Pharmaceutical Press, 2002.
70. Cakmak, I., Štrbac, D., Marschner, H. (1993). Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany*, **44(1)**: 127-132.
71. Caliskan, M., Cuming, A.C. (1998). Spatial specificity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination. *The Plant Journal*, **15**: 165-71.
72. Cantino, P.D., Harley, R.M., Wagstaff, S.J. (1992). Status and classification. In: *Advances in Labiate species*. (Harley, R.M., Reynolds, T. Eds.). Royal Botanic Gardens, pp: 511-522.
73. Caro, A., Puntarulo, S. (1999). Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radical Research*, **31**: 205–212.

74. Carson, C.F., Riley, T.V. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, *Journal of Applied Bacteriology*, **78**: 264-269.
75. Celik, A., Mercan, N., Arslan, I., Davran, H. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Nepeta cadmea*. *Chemistry of Natural Compounds*, **44(1)**: 199-120.
76. Chalchat, J.C., Gurović, M.S., Petrović, S.D., Maksimović, T.A. (2000). Composition of the essential oil of *Nepeta rtanjensis* Diklić & Milojević, *Lamiaceae* from Serbia. *Journal of essential oil research*, **12**: 238-240.
77. Chalchat, J.C., Petrović, S.D., Gorunović, M.S. (1998). Quantity and composition of essential oil of the wild plant *Nepeta nuda* L. from Yugoslavia. *Journal of Essential Oil Research*, **10**: 423-425.
78. Chauhan, K.R., Klun, J.A., Debboum, M., Kramer, M. (2005). Feeding deterrent effects of catnip oil components compared with two synthetic amides against *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology*, **42**: 643-646.
79. Cigremis, Y., Ulukanli, Z. Ilcim, A. Akgoz, M. (2010). *In vitro* antioxidant and antimicrobial assays of acetone extracts from *Nepeta meyeri* Benth. *European Review for Medicinal and Pharmacological Sciences*, **14**: 661-668.
80. Civjan, N. (2012). Plant terpenoids In: Natural products in chemical biology. (Keeling, C.I. Ed.). John Wiley & Sons.
81. Clark, L.J., Hamilton, J.G.C., Chapman, J.V., Rhodes, M.J.C., Hallahan, D.L. (1997). Analysis of monoterpenoids in glandular trichomes of the catmint *Nepeta racemosa*. *Plant Journal*, **11(6)**: 1387-1393.
82. Clauß, K., Baumert, A., Nimtz, M., Milkowski, C., Strack, D. (2008). Role of GDSL lipase-like protein as sinapine esterase in *Brassicaceae*. *The Plant Journal*, **53**: 802-813.
83. Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 8th ed. CLSI publication M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
84. Coats, J., Schultz, G., Peterson, C. (2003) Botanical products as repellents against mosquitoes and cockroaches. *226th ACS National Meeting AGRO-16*.



85. Constabel, C.P., Berger, D.R. and Ryan, C.A. (1995). Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**: 407-411.
86. Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**: 564-568.
87. Croteau, R. (2000). Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry and molecular biology of plants* (Buchanan, B.B., Ed.). American Society of Plant Physiology, Rockville, MD, USA. pp: 1250-1318.
88. Cruz-Ortega, R., Anaya, A.L., Gavilanes-Ruiz, M., Sanchez, N.S., Jimenez-Esatrada, M. (1990). Effect of diacetyl piquerol on hydrogen ion ATPase activity of microsomes from *Ipomoea purpurea*. *Journal of Chemical Ecology*, **16**: 2253-2261.
89. D'Amelio, F.S. (1999). *Botanicals. A Phytocosmetic Desk Reference*. CRC Press, London, pp. 361.
90. Da Silva, E.A., Toorop, P.E., Van Lammeren, A.M., Hilhorst, W.M. (2008). ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica*) seed germination. *Annals of Botany*, **102**: 425- 433.
91. Dabiri, M., Sefidkon, F. (2003a). Chemical composition of the essential oil of *Nepeta racemosa* Lam. from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, **18**: 157-158.
92. Dabiri, M., Sefidkon, F. (2003b). Chemical composition of *Nepeta crassifolia* Boiss. & Buhse oil from Iran. *Flavour and fragrance journal*, **18**: 225-227.
93. Dalton, C.B., Med, B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B.Proctor, M.E., Griffin, P.M. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocitogenes* in milk. *The New England Journal of Medicine*, **336(2)**: 100-105.
94. Dambolena, J.S., Zunino, M.P., López, A.G., Rubinstein, H.R., Zygadlo, J.A., Mwangi, J.W., Thoithi, G.N., Kibwage, I.O., Mwalukumbi, J.M., Kariuk, S.T. (2010). Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **11(2)**: 410-414.

95. Daouk, R.K., Dagher, S.M., Sattout, E.J. (1995). Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, **58**: 1147-1149.
96. Dash, M., Panda, S.K. (2001). Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Biologia plantarum*, **44(4)**: 587-589.
97. Dat, J., Vandenabeele, J., Vranova, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **57**: 779-795.
98. Davey, M.W., Montagu, M.V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirno, V.N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D., Fletscher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 825-860.
99. De Eknankul, W., Ellis, B.E. (1987). Tyrosine aminotransferase: the entrypoint enzyme of the tyrosine-derived pathway in rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* **26**:1941-1946.
100. De Gara, L., de Pinto, M.C., Arrigoni, O. (1997). Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum*, **100**: 894-900.
101. De Tommasi, N., De Simone, F., De Feo, V., Pizza, C. (1991). Phenylpropanoid glycosides and rosmarinic acid from *Momordica balsamina*. *Planta Medica*, **57**: 201-208.
102. De Tullio, M.C., Arrigoni, O. (2003). The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Science Research*, **13**: 249-260.
103. del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gómez, M., Barroso, J.B. (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Bototany*, **53**: 1255-1272.
104. del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Altomare, D.A., Zilinskas, B.A. (2003). Mitochondrial and peroxisomal magnese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Bototany*, **54**: 923-933.

105. Demeke, T., Chang H.G., Morris, C.F. (2001). Effect of germination, seed abrasion and seed size on polyphenol oxidase assay activity in wheat. *Plant Breeding*, **120(5)**: 369–373.
106. DePooter, H.L., Nicolai, B., De Buyck, L.F., Goetghebeur, P., Schamp, N.M. (1987) The essential oil of *Nepeta nuda*. Identification of a new nepetalactone diastereoisomer. *Phytochemistry*, **26(8)**: 2311-2314.
107. Desikan, R., Mackerness, S.A.H., Hancock, J.T., Neill, S.J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*, **127**: 159-172.
108. Devi, S.R., Prasad, M.N.V. (1998). Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Science*, **138**: 157-165.
109. Dewick, P.M. (2002). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, England.
110. Di Matteo, V., Esposito, E. (2003). Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, **2**: 95-107.
111. Diklić, N. (1972). Rod *Nepeta*, Flora Srbije, Tom VI (Josifović, M. Ed.), Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Beograd, pp: 372-376.
112. Diklić, N. (1999). *Nepeta rtanjensis* Diklić & Milojević. The Red Data Book of Flora of Serbia 1. Extinct and critically Endangered Taxa. (Stevanović, V. ed), GC Etiketa, Beograd, pp: 153-155.
113. Diklić, N., Milijević, B. (1976). *Nepeta rtanjensis* Diklić et Milojević spec. Nova vrsta iz roda *Nepeta* L.-*Glasnik prirodnjačkog muzeja u Beogradu*, **B31**: 25-35.
114. Ding, J., 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. *Jornal of Experimental Botany*, **58(13)**: 3765-3773.
115. Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995). Stress induced phenilpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, **7**: 1085-1087.

116. Downing, M.R., Mitchell, E.D. (1975). Mevalonate activating enzymes in callus culture cells from *Nepeta cataria*. *Phytochemistry*, **14**: 369-372.
117. Drazkiewicz, M., Skorzynska-Polit, E., Krupa, Z. (2004). Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals*, **17**: 379-387.
118. Dučić, T., Lirić-Rajlić, I., Mitrović, A., Radotić, K. (2003). Activities of antioxidant systems during germination of *Chenopodium rubrum* seeds. *Biologia Plantarum*, **47(4)**: 527-533.
119. Dudai, N., Poljakoff-Mayber, A., Mayer, A.M., Putievsky, E, Lerner, H.R. (1999). Essential oils as allelochemicals and their potent use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology*, **25(5)**: 1079-1089.
120. Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, **135**: 1893-1902.
121. Duke, J.A. (2002). Handbook of medicinal herbs. (Bogenschutz-Godwin, M.J., duCellie, R.J., Duke, P.A.K. Eds.) CRC Press, London.
122. Duke, S.O., Dayan, F.E., Kagan, I.A., Baerson, S.R. (2005). New herbicide target sites from natural compounds. *New discoveries in agrochemicals*, **14**: 151-160.
123. Dybing, E., Nelson, J.R., Mitchell, J.R., Sesame, H.A., Gillette, J.R. (1976). Oxidation of a methyl dopa and other catechols by chytochromes R450-generated superoxide anion: possible mechanism of methyl dopa hepatitis. *Molecular Pharmacology*, **12**: 911-920.
124. Einhellig, F.A., Ramussen, J.A., Hejl, A.M., Souza, I.F. (1992). Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis. *Journal of chemical ecology*, **19(2)**: 369-374.
125. Einsenbraun, E.J., Browne, C.E., Eliel, E.L., Harris, D.L., Rahman, A., Van der Helm D. (1981). Structure of nepetalic-acid in the solid and in solution by X-ray diffraction and NMR analysis. *Journal of Organic Chemistry*, **46**: 3302-3305.
126. El Moaty, H.I.A. (2009). Essential oil and iridoide glycoside of *Nepeta septemcrenata* Erenb. *Journal of Nature Products*, **3**: 103-111.

127. Elguera, J.C.T., Barrientos, E.Y., Wrober, K., Wrober, K. (2013). Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)), and their mixture on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35**: 431-441.
128. El-Moaty, H.I.A. (2010). Essential oil and iridoide glycosides of *Nepeta septemcrenata* Erenb. *Journal of Natural Products*, **3**: 103-111.
129. Emre, İ., Kurşat, M., Kurşat, M., Yılmaz, Ö., Erecevit, P. (2011). Some biological compounds, radical scavenging capacities and antimicrobial activities in the seeds of *Nepeta italica* L. and *Sideritis monthana* L. subsp. *monthana* from Turkey. *Grasas y Aceites*, **62(1)**: 68-75.
130. Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, **110(1)**: 76-82.
131. Escher, S., Loew, P., Arigoni, D. (1970). The role of hydroxygeraniol and hydroxynerol in the biosynthesis of loganin and indole alkaloids. *Chemical Communications*, **13**: 823-825.
132. Esmaeili, A., Rustaiyan, A., Masoudi, S. (2006). Composition of the essential oils of *Mentha aquatica* L. and *Nepeta meyeri* Benth. from Iran. *Flavour and fragrance journal*, **18(3)**: 263-265.
133. Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D. (2002). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**: 5294-5299.
134. Fadel, O., El Kirat, K., Morandat, S. (2011). The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation *in situ*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **12**: 2973-2980.
135. Falk, K.L., Gershenzon, J., Croteau, R. (1990). Metabolism of monoterpenes in cell cultures of common Sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiology*, **93**: 1559-1567.

136. Feldman, A.W., Hanks, R.W. (1968). Phenolic content in the roots and leaves of tolerant and susceptible citrus cultivars attacked by *Rodopholus similis*. *Phytochemistry*, **7**: 5-12.
137. Fisher, N.H. (1986). The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators. In: *The Science of Allelopathy* (Putnam, A.R., Tang, C.S. Eds.). Wiley-Interscience, New York. pp. 203-218.
138. Forestier, C., Guelon, D., Cluytens, V., Gillart, T., Sirot, J. De Champs, C. (2008). Oral probiotic and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in intensive care unit patients. *Critical Care*, **12**: 1-10.
139. Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F. (2011). Chemical constituents and biological activity of *Nepeta* species. *Chemistry & Biodiversity*, **8**: 1783-1817.
140. Foyer, C.H., Noctor, G. (2005). Redox homeostis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *Plant Cell*, **17**: 1866-1875.
141. Franke, R., Humphrey, J.M., Hemm, M.R., Denault, J.W., Ruegger, M.O., Cusumano, J.C., Chapple, C. (2002). The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, **30**: 33-45.
142. Fridman, E., Pichersky, E. (2005). Metabolomics, genomics, proteomics, and the identi of enzymes and their substrates and products. *Current Opinion Plant Biology*, **8**: 242-248.
143. Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **58**: 61-97.
144. Friedman, J., Waller, G. (1983). Seeds as allelopathic agents. *Journal of Chemical Ecology*, **9(8)**: 1107-1112.
145. Frohnmeyer, H., Staiger, D. (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology*, **133**: 1420-1428.

146. Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M., McCourt, P., McPeck, M.A., Thomas, T., McClung, C.R. (1996). Catalase encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* Heynh. *Plant Physiology*, **112**: 327-336.
147. Fu, Q., Wang, B.C., Jin, X., Li, H.B., Han, P., Wei, K., Zhang, X., Zhu, Y.-X. (2005). Proteomic analysis and extensive protein identification from dry, germinating *Arabidopsis* seeds and young seedlings. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **38**: 650–660.
148. Galati, E.M., Miceli, N., Galluzzo, M., Taviano, M.F., Tzakou, O. (2004). Neuropharmacological effects of epinepetalactone from *Nepeta sibthorpii* behavioral and anticonvulsant activity. *Pharmaceutical Biology*, **42**: 391-395.
149. Galati, E.M., Tzakou, O., Miceli, N., Pizzimenti, F., Rapisarda, A. (2006). Pharmacognostic screening on *Nepeta sibthorpii* Benth. *Recent Progress in Medicinal Plants*, **12**: 239-256.
150. Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D. (2001). Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiology*, **126**: 835-848.
151. Ganzera, M., Crockett, S., Tellez, M.R., Khan, I.A. (2001). Determination of nepetalactone in *Nepeta cataria* by reversed phase high performance liquid chromatography. *Pharmazie*, **56**: 896-897.
152. Garg, N., Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems*, **143**: 81-96.
153. Gautam, S.S., Sanjay, N., Prabhat, K. (2012). Screening of antibacterial activity of *Nepeta ciliaris* Benth. against respiratory tracts pathogens. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, **8**: 100-103.
154. Gerber, M., Boutron-Ruault, M.C., Hercberg, S., Riboli, E., Scalbert, A., Siess, M.H. (2002). Food and Cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bull Cancer*, **89**: 293-312.
155. Ghannadi, A., Aghazari, F., Mehrabani, M., Mohagheghzadeh, A., Mehregan I. (2003). Quantity and Composition of the SDE Prepared Essential Oil of *Nepeta macrosiphon* Boiss. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **8(2)**:103-105.

156. Gidrol, X., Lin, W.S., Degousee, N., Yip, S.F., Kush, A. (1994). Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *European Journal of Biochemistry*, **224**: 21-28.
157. Gill, S.S., Khan, N.A., Tuteja, N. (2012). Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Plant Science*, **182**: 112-120.
158. Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 909-930.
159. Gkinis, G., Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Tzakou, O. (2010). Antioxidant activity of *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda* essential oil rich in nepetalactones from Greece. *Journal of Medicinal Food*, **13(5)**:1176-1181.
160. Gkinis, G., Ioannou, E., Quesada A., Vagias C., Tzakou, O., Roussis, V. (2008). Parnapimarol and nepetaparnone from *Nepeta parnassica*. *Journal of Natural Products*, **71**: 926-936.
161. Gkinis, G., Tzakou, O., Iliopoulou, D., Roussis, V. (2003). Chemical composition and biological activity of *Nepeta parnassica* oils and isolated nepetalactones. *Zeitschrift für Naturforschung*, **58c**: 681-686.
162. Goel, A.G., Goel, A.K., Sheoron, I.S. (2003). Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology*, **160(9)**: 1093-1100.
163. Gordaliza, M., Castro, M.A., Miguel Del Corral, J.M., San Feliciano, A. (2000). Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. *Current Pharmaceutical Design*, **6**: 1811-1839.
164. Goutam, M.P., Purohit, R.M. (1974). Antibacterial activity of some essential oils. *Riechst Aromen*. **24**: 70-76.
165. Graham, L.P. (2009). *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford University Press.
166. Graßmann, J. (2005). Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins and Hormones*, **72**: 505-535.



167. Grice, H.P. (1988). Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*, **26**: 717-723.
168. Guan, L.M., Scandalios, J.G. (2002). Catalase gene expression in response to auxin-mediated developmental signals. *Physiologia Plantarum*, **114**: 288-295.
169. Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, **103(4)**: 1449–1456.
170. Habibia, Z., Masoudib, S., Rustaiyanc, A. (2004). Essential oil of *Nepeta makuensis* Jamzad et Mozaffarian from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **16(3)**: 214-221.
171. Hadian, J., Sonboli, A., Ebrahimi N.S., Mirjalili M.H. (2006). Essential oil composition of *Nepeta satureioides* from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, **42 (2)**: 175-177.
172. Hallahan, D.L., West, J.M. (1995). Production and characterisation of an acyclic monoterpene primary alcohol NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from catmint (*Nepeta racemosa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **318**: 105-112.
173. Hallahan, D.L., West, J.M., Smiley, D.W.M., Pickett, J.A. (1998). Nepetalactol oxidoreductase in trichomes of the catmint *Nepeta racemosa*. *Phytochemistry*, **48(3)**: 421-427.
174. Halliwell, B. (1999). Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **443**: 37–52.
175. Handijeva N.V., Popova S.S., Evstatievab Lj.N. (1996). Constituents of essential oils from *Nepeta cataria* L., *N. grandiflora* M.B. and *N. nuda* L. *Journal of Essential Oil Research*, **8(6)**: 639-643.

176. Hänel, H., Raether, W. (1998). A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses*, **31**: 148-154.
177. Harbone, J.B., Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry*, **55**: 481-504.
178. Harney, J.W., Barofsky I.M., Leary J.D. (1978). Behavioral and toxicological studies of cyclopentanoids monoterpenes from *Nepeta cataria*. *Lloydia*, **41**:367-374.
179. Harris, J.P., Mantle, P.G. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, **58(5)**: 709-716.
180. Hause, B., Meyer, K., Viitanen, P.V., Chapple, C., Strack, D. (2002). Immunolocalization of 1-O-sinapoylglucose: malate sinapoyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **215**: 26-32.
181. Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P. Denning, D.W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, **153**: 1677-1692.
182. Hejl, A.M., Einhellig, F.A., Rasmussen, J.A. (1992). Effects of juglone on growth, photosynthesis and respiration. *Journal of Chemical Ecology*, **19(3)**: 559-563.
183. Heuskin, S., Godin, B., Leroy, P., Capella, Q., Wathelet, J.-P., Verheggen, F., Haubruge, E., Lognay, G. (2009). Fast gas chromatography characterization of purified semiochemicals from essential oils of *Matricaria chamomile* L. (*Asteraceae*) and *Nepeta cataria* L. (*Lamiaceae*). *Journal of Chromatography A*, **14**: 2768-2775.
184. Hiller, K., (1965). Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoidae. 1. Mitteilung: *Sanicula europaea* L.—Isolierung und quantitative Erfassung von Chlorogen- und Rosmarinsäure. *Pharmazie*, **20**: 574–579.
185. Hite, D.R.C., Auh, C., Scandalios, J.G. (1999). Catalase activity and hydrogen peroxide levels are inversely correlated in maize scutella during seed germination. *Redox Report*, **4**: 29-34.

186. Hou, C.T., Ciegler, A., Hesseltine, C.W. (1972). New mycotoxin, trichotoxin A, from southern leaf blight-infected from *Trichoderma viride* isolated corn. *Applied and Environmental Microbiology*, **23(1)**: 183-189.
187. Hou, Z.F., Tu, J.Q., Li, Y. (2002). Three new phenolic compounds from *Nepeta prattii*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **49**:255-258.
188. Huang, A.H.C., Trelease, R.N., Moore, T.S. (1983). Plant peroxisomes. American society of plant physiologists. New York: Academic Press.
189. Humphreys, J.M., Hemm, M.R., Chapple, C. (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multi-functional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **96**: 10045-10050.
190. Hussain, J., Jamila, N., Abdullah, S., Abbas, G., Ahmed, S. (2009). Platelet aggregation, antiglycation, cytotoxic, phytotoxic and antimicrobial activities of extracts of *Nepeta juncea*. *African Journal of Biotechnology*, **8(6)**: 935-940.
191. Hussain, S.Z., Marin, P.D., Diklić, N., Petković, B. (1989). Micromorfological and phytochemical studies in two new endemic *Nepeta* (*Lamiaceae*) species in Yugoslavia. *Pakistan Journal of Botany*, **21(2)**: 210-217.
192. Hyun Eom, S., Yang, H.S., Weston, L.A. (2006). An evaluation of the allelopathic potential of selected perennial groundcovers: foliar volatiles of catmint (*Nepeta faassenii*) inhibit seedling growth. *Journal of Chemical Ecology*, **32**: 1835-1848.
193. Iacopini, P., Baldi, M. Storchi, P., Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**: 589-598.
194. Ibrahim, S.A., Ali, M.S. (2007). Constituents of *Nepeta crassifolia* (*Lamiaceae*). *Turkish Journal of Chemistry*, **31**: 463-470.

195. Ibrahim, M.M., Bafeel S.O. (2011). Molecular and physiological aspects for *Lepidium sativum* tolerance in response to lead toxicity. *Fresenius Environmental Bulletin*, **20(8)**: 40- 56.
196. Ikeda, H., Esaki, N., Nakai, S., Hashimoto, K., Uesato, S., Soda, K. Fujita, T. (1991). Acyclic monoterpene primary alcohol:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase of *Rauwolfia serpentina* cells: the key enzyme in biosynthesis of monoterpene alcohols. *Journal of Biochemistry*, **109**: 341-347.
197. Inouye, H. (1991). Methods in plant biochemistry. (Charlwood, B.V., Banthorpe, D.V. Eds.). Academic Press, London. pp: 99-144.
198. Islam, A.K.M., Kato-Noguchi, H. (2012). Allelopathic potentiality of medicinal plant *Leucas aspera*. *International Journal of Sustainable Agriculture*, **4**: 1-7.
199. Jahan, N., Israr, M., Mansoor A., Yousafzai, A. (2006). Phytotoxicity of *Acropitilon repens* (Asteraceae) and *Nepeta pretervisa* (Lamiaceae). *Journal of Applied and Emerging sciences*, **1(3)**: 164-166.
200. Jahangira, M., Abdel-Farida, I.B., Kima, H.K., Choia, Y.H., Verpoortea, R. (2009). Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environmental and Experimental Botany*, **67(1)**: 23-33.
201. Jamzad, Z., Ingrouille, M., Simmonds, M. (2003). Three new species of *Nepeta* (Lamiaceae) from Iran. *Taxon*, **52**: 92-98.
202. Jančić, R., Stošić, D., Mimica-Dukić, N. (1995). Fam: Lamiaceae, In: Aromatične biljke Srbije. Dečje novine, Gornji Milanovac, Serbia & Montenegro, pp. 211-272.
203. Javidnia, K., Miri, R., Mehregan, I., Sadeghpour, H. (2005). Volatile constituents of the essential oil of *Nepeta ucrainica* L. ssp. *kopetdaghensis* from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, **20(2)**: 219-221.
204. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005). Modern food microbiology. (Heldman, D.R. Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
205. Jeong, G.A., Park, D.H. (2007). Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **130**: 436-446.

206. Jimenez-Atienzer, M., Pedreño, M.A., Caballero, N., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F. (2007). Characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from peach mesocarp (*Prunus persica* L. Cv. Babygold) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**: 1682-1690.
207. Job, C., Rajjou, L., Lovigny, Y., Belghazi, M., Job, D. (2005). Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination, *Plant Physiology*, **138**: 790-802.
208. Jones, C.D., Woods, K.E., Setze, W.N. (2012). A chemical ecological investigation of the allelopathic potential of *Lamium amplexicaule* and *Lamium purpureum*. *Open Journal of Ecology*, **2(4)**: 167-177.
209. Jose, S., Gillespie, A.R. (1998). Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping. II. Effects of juglone on hydroponically grown corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.) growth and physiology. *Plant and Soil*, **203**: 199-205.
210. Jovanović, S.V., Steenken, S., Simić, M.G., Hara, Y. (1998). Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals. In: Flavonoids in health and disease (Rice-Evans, C., Packer, L.Eds.). New York: Marcel Dekker. pp. 137–161
211. Jovanović-Đurđević, G., Ivanić, R., Savin, K. (1989). Nepetalactone, a dominant component in the essential oil of *Nepeta rtanjensis* Diklić & Milojević. *Acta Pharmaceutica Yugoslavica*, **39**: 253-257.
212. Juraldo, R.L., Farley, M.M., Pereira, E., Harvey, R.C., Schuchat, A., Wenger, J.D., Stephens, D.S. (1993). Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases*, **17(2)**: 224-227.
213. Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mentis, A., Mitaku, S., Charvala, C. (2001). Composition of the essential oil of two *Nepeta* species and *in vitro* evaluation of their activity against *Helicobacter pylori*. *Planta medica*, **67**: 880-883.

214. Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N., Soyer, Y. (2005). Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **29**: 297-303.
215. Karaman, S., Cömlekçiöğolu, N. (2007). Essential oil composition of *Nepeta cilici* Boiss. Apud Bentham and *Phlomis viscosa* Poiret from Turkey. *International Journal of Botany*, **3(1)**: 122-124.
216. Karruppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3(13)**: 1222-1239.
217. Kavanagh, K. (2005). Fungi. Biology and Applications. John Wiley and Sons. England.
218. Kaya, A., Demirci, B., Baser, K.H.C. (2007). Micromorphology of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. & Mey. var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. *South African Journal of Botany*, **73**: 29-34.
219. Kelley, C.J., Mahajan, J.R., Brooks, L.C., Neubert, L.A., Breneman, W.R., Carmack, M., (1975). Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderales* Dougl. ex Lehm. (Boraginaceae). 1. Isolation and structure determination of lithospermic acid. *The Journal of Organic Chemistry*, **40**: 1804-1815.
220. Kim, D.O., Lee, C.Y. (2004). Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**: 253-273.
221. Kintzios, S. Nikolaou, A. Skoula, M. (1999). Somatic embryogenesis and *in vitro* rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf callus cultures. *Plant Cell Reports*, **18**: 462-466.
222. Kirby, T.W., Lancaster, J.R., Fridovich, I. (1981). Isolation and characterization of the iron-containing superoxide dismutase of *Methanobacterium bryantii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **210**: 140-148.

223. Kliebenstein, D.J., Monde, R., Last, R.L. (1998). Superoxid dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*, **118**: 637-650.
224. Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, **1(3)**: 119-28.
225. Knoss, W. (1999). *Marrubium vulgare*: *in vitro* culture and the production of diterpene marrubin and other secondary metabolites. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants XI. (Bajaj Y.P.S. Ed.). Springer Verlag Berlin Heidelberg.
226. Kobaisy, M., Tellez, M.R., Dayan, F.E., Mamonov, L.K., Mukanova, G.S., Sitpaeva, G.T., Gemejjeva, N.G. (2005). Composition and phytotoxic activity of *Nepeta pannonica* L. essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, **17(6)**: 704-707.
227. Kokdil, G., Kurucu, S., Yıldız, A. (1998). Essential oil composition of *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda*. *Flavour and Fragrance Journal*, **13(4)**: 233-234.
228. Kokdil, G., Topcu, G., Krawiec, M., Watson, W.H. (1998). Nepetanudone, a dimer of the  $\alpha$ -pyrone 5, 9- dehydronepetalactone. *Journal of Chemical Crystallography*, **28(7)**: 517-519.
229. Kokdil, G., Kurucu, S., Topçu, G. (1997). Composition of the essential oil of *Nepeta nuda* L. ssp. *albiflora* (Boiss.) Gams. *Flavour and Fragrance Journal*, **11(3)**: 167-169.
230. Kono, Y., Fridovich I. (1983). Inhibition and reactivation of Mn-catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, **258(22)**: 13646-13648.
231. Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H, Cakmakci, R., Kesdek, M., Mete, E. (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, **99**: 8788-8795.
232. Kordali, S., Cakir, A., Sutay, S. (2007). Inhibitory effects of monoterpenes on seed germination and seedling growth. *Zeitschrift für Naturforschung*, **62c**: 207-214.

233. Kranner, I., Grill, D. (1993). Content of low-molecular weight thiols during the imbibition of pea seeds. *Physiologia Plantarum*, **88**: 557-562.
234. Kranner, I., Roach, T., Beckett, R.P., Whitaker, C., Minibayeva, F.V. (2010). Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology*, **167**: 805-811.
235. Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Mihailov, A.L. (2010). Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Bioclinica Polonica*, **57(2)**: 229-234.
236. Kraujalis, P., Rimantas, P., Ragazinskiene O. (2011). Antioxidant activities and phenolic composition of extract from *Nepeta* plant species. *Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology*, Faculty of Food Technology, Latvia University of Agriculture, Jelgava, Latvia.
237. Krzyzanowska, J., Pecio, J.B., Stochmal, L., Wieslaw. O., Czubacka, A., Przybys, M., Doroszevska, T. (2011). Determination of polyphenols in *Mentha longifolia* and *M. piperita* field-grown and *in vitro* plant samples using UPLC-TQ-MS. *Journal of AOAC International*, **94(1)**: 43-50.
238. Kubo, A., Aono, M., Nakajima, N., Saji, H., Tanaka, K. Kondo, N. (1999). Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, **112**: 279-290.
239. Kuhlman, A., Röhl, C. (2006). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro*. Cultures of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and their anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia. *Pharmaceutical Biology*, **44 (6)**: 401-410.
240. Kundaković, T., Milenković, M., Topić A., Stanojković, T., Juranić, Z., Lakušić B. (2011). Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Teucrium scordium* L. (*Lamiaceae*) extracts. *African Journal of Microbiology Research*, **5(18)**: 2692-2696.



241. Kusunose, E., Ichihara, K., Noda, Y., Kusunose, M. (1976). Superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biochemistry*, **80**: 1343-1352.
242. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 680. *Nature*, **227**: 680-685.
243. Laguerre, M., López-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Baréa, B., Cambon, E., Tchobo, P.F., Barouh, N., Villeneuve, P. (2008). Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: a novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe. *Analytical Biochemistry*, **380**: 282-290.
244. Lamaison, J.L., Patitjean-Freytet, C., Carnat, A. (1991). Medicinal *Lamiaceae* with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **66(7)**:185-188.
245. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 453-462.
246. Lasure, A., Van Poel, B., Pieters, L., Claeys, M., Gupta, M., Vanden Berghe, D., Vlietinck, A.J. (1994). Complement-inhibiting properties of *Apeiba tibourbou*. *Planta Medica*, **60**: 276-277.
247. Lawrence, B.M. (1992). Chemical components of *Labiatae* oils and their exploitation. In: *Advances in Labiatae Science* (Harley RM, Reynolds T, Eds.). Royal Botanical Gardens. pp. 399-436.
248. Leather, G.R. (1983). Weed control using allelopathic crop plants. *Journal of Chemical Ecology*, **9(8)**: 983-990.
249. Lee, J.S., Lee, C.Y., Eom S.H., Kim J.K. Park, N.I., Park, S.U. (2010b). Rosmarinic acid production from transformed root cultures of *Nepeta cataria*. *Scientific Research and Essays*, **5(10)**: 1122-1126.
250. Lee, K.P., Piskurewicz, U., Turečková, V., Strnad, M., Lopez-Molina, L. (2010a). A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in *Arabidopsis* dormant seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107(44)**: 109-113.

251. Lee, T.T. (1977). Role of phenolic inhibitors in peroxidase-mediated degradation of indole-3-acetic acid. *Plant Physiology*, **59(3)**: 372-375.
252. Lee, Y.P., Baek, K.H., Lee, H.S., Kwak, S.S., Bang, J.W., Kwon, S.Y. (2010c). Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, **61(9)**: 2499-2506.
253. Lefer, D.J., Granger, D.N. (2000). Oxidative stress and cardiac disease. *The American Journal of Medicine*, **109**: 315-323.
254. Leja, L., Thoppil, J.E. (2007). Antimicrobial activity of methanol extract of *Origanum majorana* L. (Sweet Marjoram). *Journal of Environmental Biology*, **28(1)**: 145-146.
255. Lemke, T.L. (2003). Review of organic functional Groups, Introduction to medicinal organic chemistry, Lippincott Williams & Wilkins.
256. Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M. (2004a). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of the Physical Chemistry A*, **108(22)**: 4916-4922.
257. Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M. (2004b). Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its radicals in the gas phase and in solvent. *Theoretical Chemistry Accounts*, **111(2-6)**: 210-216.
258. Leopoldini, M., Prieto Pitarch, I., Russo, N., Toscano, M. (2004c). Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry A*, **108(1)**: 92-96.
259. Letchamo, W., Korolyuk, E.A., Tkachev, A.V. (2005). Chemical screening of essential oil bearing flora of Siberia IV. Composition of the essential oil of *Nepeta sibirica* L. tops from Altai region. *Journal of Essential Oil Research*, **17**: 487-489.

260. Liblikas, I., Santangelo, E.M., Sandell, J., Baeckström, P., Svensson, M., Jacobsson, U., Unelius, C.R. (2005). Simplified isolation procedure and interconversion of the diastereomers of nepetalactone and nepetalactol. *Journal of Natural Products*, **68**: 886-890.
261. Linkies, A., Graeber, K., Knight, CLeubner-Metzger, G. (2010a). The evolution of seeds. *New Phytologist*, **186**: 817–831.
262. Linkies, A., Schuster-Sherpa U., Tintelnot S., Leubner-Metzger G., Müller K. (2010b). Peroxidases identified in a subtractive cDNA library approach show tissue-specific transcript abundance and enzyme activity during seed germination of *Lepidium sativum*. *Journal of Experimental Botany*, **61(2)**: 491–502.
263. Litvinenko, V.I., Popova, T.P., Simonjan, A.V., Zoz, I.G., Sokolov, V.S. (1975). “Gerbstoffe” und Oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiaten. *Planta Medica*, **27**: 372–380.
264. Liu, P.P, Koizuka, N, Homrichhausen, T.M., Hewitt, J.R., Martin, R.C., Nonogaki, H. (2005). Large-scale screening of *Arabidopsis* enhance-trap lines for seed germination-associated genes. *The Plant Journal*, **41**: 936-944.
265. Ljaljević Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J., Grubišić, D. (2011a). Inhibitory effect of essential oil from *Nepeta rtanjensis* on fungal spore germination. *Central European Journal of Biology*, **6(4)**: 583-585.
266. Ljaljević Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J., Grubišić, D. (2011b). In vitro antifungal and demelanizing activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil against the human pathogen *Bipolaris spicifera*. *Archives of Biological Sciences*, **63(3)**: 897-905.
267. Ljaljević Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J., Soković, M., Mišić, D., Grubišić, D., Ristić, M. (2008). Antifungal activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil. *Journal of Serbian Chemical Society*, **73**: 961-965.
268. Ljaljević-Grbić, M., Vukojević, J., Soković, M., Grubišić, D., Ristić, M. (2007). The Effect of *Nepeta rtanjensis* essential oil on test micromycetes micelya growth. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke*, **113**: 173-177.
269. Loir, Y.L., Baron, F., Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, **2(1)**: 63-76.

270. Macháčková, I., Zmrhal, Z. (1981). Is peroxidase involved in ethylene biosynthesis? *Physiologia Plantarum*, **53(4)**: 479-482.
271. Madheswaran, R., Balachandran, C. Murali Manohar, B. (2004). Influence of dietary culture material containing aflatoxin and T2 toxin on certain serum biochemical constituents in Japanese quail. *Mycopathologia*, **158**: 337-341.
272. Madinez, M.V., Whitaker, J.R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, **6**: 195-200.
273. Mahboubi, M., Kazempour, N., Ghazian, F. Taghizadeh M. (2011). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of *Nepeta persica* Boiss. essential oil. *Herbapolonica*, **57(1)**: 63-71.
274. Mahmoud, S.S., Croteau, R.B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, **7(8)**: 366-373.
275. Mancini, E., Apostolides, A.N., Feo, V., Formisano, C., Rigano, D., Piozzi, F., Senatore, F. (2009). Phytotoxic effects of essential oils of *Nepeta curviflora* Boiss. and *Nepeta nuda* L. subsp. *albiflora* growing wild in Lebanon. *Journal of Plant Interactions*, **4(4)**: 253-259.
276. Maness, P.C., Smolinski, S., Blake, D.M., Huang, Z., Wolfrum, E.J., Jacoby, W.A. (1999). Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, **65(9)**: 4094-4098.
277. Marin, P. (2003). Biohemijska i molekularna sistematika biljaka. *NNK Internacional*, Beograd.
278. Martin, K.R., Appel, C.L. (2010). Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements*, **2**: 1-12.
279. Mathela, C.S., Kharkwal, H., Laurent, R. (1994). Investigations on Himalayan *Nepeta* Species. VI. Essential Oil of *Nepeta discolor* Benth. *Journal of Essential Oil Research*, **6(5)**: 519-521.

280. Matsuno, M., Nagatsu, A., Ogihara, Y., Ellis, B.E., Mizukami, H. (2002). CYP98A6 from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-4-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid biosynthesis. *FEBS Letters*, **514**: 219-224.
281. Mayer, A.M, Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, **18**: 193-215.
282. Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? *Phytochemistry*, **67**: 2318-2331.
283. McDonald, M.B. (1999). Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology* **27**: 177-237.
284. McElvain, S.M., Eisenbraun, E.J. (1955). The constituents of the volatile oil of catnip. The structure of nepetalic acid and related compounds. *Journal of the American Chemical Society*, **77(6)**: 1599-1567.
285. Mehrabani, M., Asadipour, A., Amoli, S. (2004). Chemical constituents of the essential oil of *Nepeta depauperata* Benth. From Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **12(3)**: 98-100.
286. Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, **49**: 69-76.
287. Meyer, K., Cusumano, J.C., Somerville, C., Chapple, C.C.S. (1996). Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**: 6869-6874.
288. Miao, Y., Lv, D., Wang, P., Wang, X.C., Chen J., Miao, C., Song C.P. (2006). An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell*, **18**: 2749-2766.
289. Miceli, N., Taviano, M.F., Giuffrida, D., Trovato A., Tzakou O., Galati E.M. (2005). Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**: 261-266.

290. Milkowski, C., Strack, D. (2010). Sinapate esters in brassicaceous plants: biochemistry, molecular biology, evolution and metabolic engineering. *Planta*, **232**: 19-35.
291. Milkowski, C., Strack, D. (2004). Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry*, **65**:517-524.
292. Mishra, B.B., Gautam, S., Sharma, A. (2012). Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*) *Food Chemistry*, **134**: 1855-1861.
293. Mišić, D. (2003.) Micropropagation of *Nepeta rtanjensis* Diklić & Milojević as the efficient method for *ex situ* protection. MSc Thesis, Faculty of Biology. - Beograd.
294. Mišić, D., Maksimović, V., Todorović, S., Grubišić, D., Konjević, R. (2005a). Influence of carbohydrate source on *Nepeta rtanjensis* growth, morphogenesis and nepetalactone production *in vitro*. *Israel Journal of Plant Sciences*, **53**:103–8.
295. Mišić, D.M, Ghalawenji, N.A, Grubišić, D.V, Konjević, R.M. (2005b). Micropropagation and reintroduction of *Nepeta rtanjensis*, an endemic and critically endangered perennial of Serbia. *Phyton-Annales Rei Botanicae*, **45**: 9-20.
296. Mitić, N., Dmitrović, S., Đorđević, M., Zdravković-Korać, S., Nikolić, R., Raspor, M., Đorđević, T., Maksimović, V., Živković, S., Krstić-Milošević, D., Stanišić, M., Ninković, S. (2012). Use of *Chenopodium murale* L. transgenic hairy root *in vitro* culture system as a new tool for allelopathic assays. *Journal of Plant Physiology*, **169(12)**: 1203-1211.
297. Modnicki, D, Tokar, M, Klimek, B. (2007). Flavonoids and phenolics acids of *Nepeta cataria* L. var. *citriodora* (Becker) Balb. (*Lamiaceae*). *Acta Poloniae Pharmaceutic Drug Research*, **64**: 247-225.
298. Mohagheghzadeh, A., Shams-Ardakani, M., Ghannadi, A., Minaeian, M. (2004). Rosmarinic acid from *Zataria multiflora* tops and *in vitro* cultures. *Fitoterapia*, **75**: 315-321.
299. Molisch, H. (1937). Der Einfluss einer Pflanze auf die andere- Allelopathie. Fischer, Jena 64-67.

300. Moller, I.M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**: 561-91.
301. Morohashi, Y. (2002). Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1643-1650.
302. Morris, K., Linkies, A., Müller, K., Oracz, K., Wang, X., Lynn, J., Metzger, G., Finch-Savage, W. (2011). Regulation of seed germination in the close *Arabidopsis* relative *Lepidium sativum*: A global tissue-specific transcript analysis <sup>1</sup>[C][W][OA]. *Plant Physiology*, **155**: 1851-1870.
303. Mothana, R.A. (2012). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Nepeta deflersiana* growing in Yemen. *Records of Natural Products*, **6(2)**: 189-193.
304. Motohashi, N., Shirataki, Y., Kawase, M., Tani, S., Sakagami, H., Satoh, K., (2002). Cancer prevention and therapy with kiwifruit in Chinese folklore medicine: a study of kiwifruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **81**: 357-364.
305. Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, A.M., Fry, S.C., Liszky, A., Metzger, G.L. (2009). *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*, **150**: 1855-186.
306. Müller, K., Tintelnot, S., Leubner-Metzger, G. (2006). Endosperm limited *Brassicaceae* seed germination: abscisic acid inhibits embryo induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **47**: 864-877.
307. Müller, W.H. (1986). Allelochemical mechanisms in the inhibition of herbs by chaparral shrubs. In *The science of allelopathy* (Putnam, A.R., Tang, C.S. Eds.). Wiley-Interscience, New York. pp. 189-199.
308. Müller, W.H., Müller, C.H. (1964). Volatile growth inhibitors produced by *Salvia species*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, **91**: 327-330.
309. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497.

310. Muthuswamy, S. Rupasinghe, H.P.V. (2007). Fruit phenolics as natural antimicrobial agents: Selective antimicrobial activity of catechin, chlorogenic acid and phloridzin. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **5(3-4)**: 5-8.
311. Mutlu, S., Atici, O. (2009). Allelopathic effect of *Nepeta meyeri* Benth. extract on seed germination and seedling growth of some crop plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, **31**: 81-93.
312. Mutlu, S., Atici, O., Esim, N., Mete, E. (2011). Essential oils of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) induce oxidative stress in early seedlings of various weed species. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**: 943–951.
313. Nair, R.B., Joy, R.W., Kurylo, E., Shi, X.H., Schnaider, J., Datla, R.S.S., Keller, W.A., Selveraj, G. (2000). Identification of a CYP84 family of cytochrome P450-dependent mono-oxygenase genes in *Brassica napus* and perturbation of their expression for engineering sinapine reduction in the seeds. *Plant Physiology*, **123**: 1623-1634.
314. Nair, R.B., Xia, Q., Kartha, C.J., Kurylo E., Hirji, R.N., Datla, R., Selvaraj, G. (2002). *Arabidopsis* CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. *Plant Physiology*, **130**: 210-220.
315. Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, **31(1)**: 247-56.
316. Nedelkova, Y.Y., Dimitrova, M.A., Yordanova, Z.P., Kapchina-Toteva, V.M. (2011). Micropropagation of *Nepeta nuda* ssp. *nuda* (*Lamiaceae*)-influences of auxins and cytokinins. I *International Symposium on Medicinal, Aromatic and Nutraceutical Plants from Mountainous Areas*.
317. Nedorostova, L. Kloucek, P., Stolcova, M., Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, **20(2)**: 157-160.
318. Neill, S., Desikan, R. Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 388-395.
319. Nešković, M., Konjević R., Čulafić Lj. (2003). Fiziologija biljaka, *NNK-International*, Beograd.



320. Nestorović, J., Mišić, D., Šiler, B., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Maksimović, V., Grubišić, D. (2010). Nepetalactone content in shoot cultures of three endemic *Nepeta* species and the evaluation of their antimicrobial activity. *Fitoterapia*, **81**: 621-626.
321. Nestorović, J., Mišić, D., Šiler, B., Živković, S., Malović, G., Perišić, M., Stojić, A., Grubišić, D. (2010): Application of PTR-MS in detection of volatile compounds: in vitro culture of three *Nepeta* species. *20th European Conference on the Atomic and Molecular Physics of Ionized Gases (20th ESCAMPIG)*, Novi Sad, Serbia, Proceedings: WPM P3.57.
322. Nestorović, J., Mišić, D., Šiler, B., Živković, S., Stojić, A., Perišić, M., Grubišić, D. (2009b): PTR-MS detection of nepetalactone in shoot cultures of three *Nepeta* species under different carbohydrate source. *2nd International Symposium „New Researches in Biotechnology“*, Bucharest, Romania, Proceedings: 138-145.
323. Nestorović, J., Mišić, D., Stojić, A., Perišić, M., Živković, S., Šiler, B., Aničić, M., Malović, G., Grubišić, D. (2009a): *In vitro* selection of nepetalactone-rich genotypes of *Nepeta rtanjensis* by using HPLC and PTR-MS. *4th International Conference on Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry and Its Applications*, Innsbruck, Austria, Proceedings: 263-267.
324. Ni, B.R. Bradford K.J. (1993). Germination and dormancy of abscisic acid- and gibberellin-deficient mutant tomato seeds: Sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin, and water potential. *Plant Physiology*, **101**: 607-617.
325. 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.
326. Noguchi, H.K., Ino, T. (2005). Possible involvement of momilactone B in rice allelopathy. *Journal of Plant Physiology*, **162**: 718-721.
327. Nori-Shargha, D., Baharvand, B. (2005). The volatile constituents of *Nepeta elymatica* Bornm. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **17(3)**: 329-330.

328. Nostro, A., Germanò, M.P., D'Angelo, A., Marino, A., Cannatelli, M.A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, **30(5)**: 379-384.
329. Nurmam, G., Strack, D. (1979). Sinapine esterase. Part I. Characterization of sinapine esterase from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **34c**: 715-720.
330. Nurmam, G., Strack, D. (1981). Formation of 1-sinapoylglucose by UDP glucose: sinapic acid glucosyltransferase from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Eitschrift für Pflanzenzuchtung-Journal of Plant Breeding* **102**: 11-17.
331. Ober, D., Hartmann, T. (1999). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proceedings of the National Academi of Sciences USA*, **96**: 14777-14782.
332. Obroucheva, N.V., Antipova, O.V. (1997). Physiology of the initiation of seed germination. *Russian Journal of Plant Physiology*, **44**: 250-264.
333. Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., Yamaguchi S. (2003). Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell*, **15**: 1591-1604.
334. Oracz, K., Bailly, C., Gniazdowska, A., Côme, D., Corbineau, F., Bogatek, R. (2007). Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. *Journal of Chemical Ecology*, **33**: 251-264.
335. Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek R, Corbineau, F., Bailly, C. (2009). The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology*, **150**: 494-505.
336. Oracz, K., Voegele, A., Tarkowská, D., Jacquemoud, D., Turečková, V., Urbanová, T., Strnad, M., Sliwiska, E., Leubner-Metzger, G. (2011). Myrigalone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide Production required for embryo extension growth and endosperm rupture. *The Plant Cell*, **18**: 2749-2766.

337. Osakabe, K., Tsao, C.C., Li, L., Popko, J.L., Umezawa, T., Carraway, D.T., Smeltzer, R.H., Joshi, C.P., Chiang, V.L. (1999). Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **96**: 8955-8960.
338. Oskabe, N, Takano, H, Sanbongi, C, Yasuda, A, Yanagisawa, R, Inoue, K., Yoshikawa, T. (2004). Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. *Biofactors*, **21**: 127-131.
339. Paré, P.W., Tumlinson, H. Parnham, M.J., Kesselring, K., (1985). Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, **10**: 756-757.
340. Parr, A.J., Bolwell, G.P. (2000). Phenols in plant and man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 985-1012.
341. Perillo, M.A., Guidoti, A., Costa, E., Yu, R., Maggio, B. (1994). Modulation of phospholipase A2 and C activities against dilauroylphosphorylcholine in mixed monolayers with semisynthetic derivatives of ganglioside and sphingosine. *Molecular Membrane Biology*, **11**: 119-126.
342. Perry, N.S.L., Bollen, C., Perry, E.K. Ballard, C. (2003). *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Biochemistry and Behavior*, **75**: 651-659.
343. Petersena, M., Simmonds, M.S.J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, **62**: 121-125.
344. Peterson, C., Coats, J. (2001). Insect repellents-past, present and future. *Pesticide Outlook*, **12**: 154-8.
345. Peterson, C.J., Nemetz, L.T., Jones, L.M., Coats, J.R. (2002). Behavioral activity of catnip (*Lamiaceae*) essential oil components to the German cockroach (*Blattodea: Blattellidae*). *Journal of Economic Entomology*, **95**: 377-380.
346. Peterson, M. (1997). Cytochrome P-450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry*, **45**: 1165-1172.

347. Peterson, M., Hausler, E., Karwatzki, B., Meinhard, J. (1993). Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta*, **189**: 10-14.
348. Petruzzelli, L., Müller, K., Hermann, K., Leubner-Metzger, G. (2003). Distinct expression patterns of  $\beta$ -1, 3-glucanases and chitinases during the germination of *Solanaceous seeds*. *Seed Science Research*, **13**: 139-153.
349. Peuchant, E., Brun, J., Rigalleau, V., Dubourg, L., Thomas, M., Daniel, J. (2004). Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 Diabetes. *Clinical Biochemistry*, **37**: 293-298.
350. Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**: 1035-1042.
351. Polsomboon, S., Grieco, J.P., Achee, N.L., Chauhan, K.R., Tanasinchayakul, S., Pothikasikorn, J., Chareonviriyaphap, T. (2008). Behavioral responses of catnip (*Nepeta cataria*) by two species of mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Anopheles harrisoni*, in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **24(4)**: 513-519.
352. Poser, G.L., Menut, C., Toffoli, M.E., Verin, P., Sobral, M., Bessiere, J.M., Lamaty, G., Henriques, A.T. (1996). Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian *Lamiaceae Hesperozygis ringens* (Benth.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**: 1829-1832.
353. Potter, J.D. (2005). Vegetables, fruit and cancer. *Lancet*, **366**: 527-530.
354. Pourcel, L., Routaboul, J., Kerhoas L., Caboche M., Lepinie, L., Debeaujona I. (2005). TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Cell*, **17**: 2966-2980.
355. Priestley, D.A. (1986). Seed aging. Implications for seed storage and persistence in the soil. Ithaca: Cornell University Press.
356. Prithiviraj, B., Perry, G., Badri, D.V., Vivanco, M. (2006). Chemical facilitation and induced pathogen resistance mediated by a root-secreted phytotoxin. *New Phytologist*, **173(4)**: 852-860.

357. Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.J.E., Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food chemistry*, **95**: 664-671.
358. Proestos, C., Lytoudi, K., Mavromelanidou O.K., Zoumpoulakis P. Sinanoglou V.J. (2013). Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants*, 2:11-22.
359. Puntarulo, S., Galleano, M., Sanchez, R.A., Boveris, A. (1991). Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1074**: 277-283.
360. Puntarulo, S., Sanchez, R.A., Boveris, A. (1988). Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiology*, **86**: 626-30.
361. Putnam, A.R. (1985). Weed allelopathy, In: *Weed Physiology* (Duke S.O. Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 131-150.
362. Quiroga, M., Guerrero C., Botella, M.A., Barceló, A., Amaya, I., M.I. Medina, F.J. Alonso, S.M. de Forchetti, H. Tigier, Valpuesta, V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, **122**: 1119-1127.
363. Rabbani, M., Sajjadi, S.E., Mohammadi, A. (2008). Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, **5**: 181-186.
364. Radulović, N., Blagojević, P.D., Rabbitt, K., Meneses, F.S. (2011). Essential oil of *Nepeta x faassenii* Bergmans ex Stearn (*N. mussinii* Spreng. x *N. nepetella* L.): a comparison study. *Natural Product Communication*, **6(7)**: 1015-1022.
365. Rahnama, H., Ebrahimzadeh, H. (2006). Antioxidant isozymes activities in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress. *Journal of Science*, **17(3)**: 225-230.

366. Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C., Job, D. (2004). The effect of alpha-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesize mRNAs during germination. *Plant Physiology*, **134**: 1598-1613.
367. Rather, M.A., Tauheeda, H., Dar, B.A., Shawl, A.S., Qurishi M.A., Ganai, B.A. (2012). Essential oil composition of *Nepeta raphanorhiza* Benth. growing in Kashmir valley. *Records of Natural Products*, **6(1)**: 67-70.
368. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radicals Biology and Medicine*, **26**: 1231-1237.
369. Regnier, F.E., Waller, G.R., Eisenbraun, E.J. (1967). Studies on the composition of the essential oils of three *Nepeta* species. *Phytochemistry*, **6**: 1281-1290.
370. Rice, E.L. (1984). Allelopathy. Academic Press, Orlando, Florida.
371. Richardson, A., McDougall, G.J. (1997). A laccase type polyphenol oxidase from lignifying xylem of tobacco. *Phytochemistry*, **44(2)**: 229-235.
372. Rigano, D., Arnold, N.A., Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Piozzi, F., Senatore, F. (2011). Characterisation of the essential oil of *Nepeta glomerata* Montbret et Aucher ex Benthham from Lebanon and its biological activities. *Natural Product Research*, **25(6)**: 614-626.
373. Rivero, R.M., Ruiz, J.M., García, P.C., López-Lefebvre, L.R., Sánchez, E., Romero L. (2001). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, **160(2)**: 315-321.
374. Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**: 2866-2887.
375. Romagni, J.G., Allen, S.N., Dayan, F.E. (2000). Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *Journal of Chemical Ecology*, **26(1)**: 303-313.

376. Rustaiyan, A., Komeilizadeh, H., Monfared, A., Nadji K., Masoudi, S., Yari, M. (2000). Volatile constituents of *Nepeta denudata* Benth. and *N. cephalotes* Boiss. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **12(4)**: 459-461.
377. Rustaiyan, A., Monfared, A., Masoudi, S. (1999). Composition of the essential oil of *Nepeta asterotrichus* Rech. F. et Aell. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **11(2)**: 229-230.
378. Rustaiyan, A., Najadi, K. (1999). Composition of the essential oils of *Nepeta ispahamica* Boiss. and *Nepeta binaludensis* Jamzad from Iran. *Flavour and fragrance journal*, **14**: 35-37.
379. Rusydi, M.R.M., Azrina A. (2012). Effect of germination on total phenolic, tannin and phythic acid contents in soybean and peanut. *International Food Research*, **19(2)**: 673-677.
380. Safaei-Ghomi, J., Nahavandi, S., Batooli, H. (2011). Studies on the antioxidant activity of the volatile oil and methanol extract of *Nepeta laxiflora* Benth. and *Nepeta sessilifolia* Bunge. from Iran. *Journal of Food Biochemistry*, **35**: 1745-4514
381. Safaei-Ghomia, J., Bamoniria, A., Haghania, M., Batooli H. (2006). Essential oil composition of *Nepeta gloeocephala* Rech. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **18 (6)**: 635-637.
382. Saffar, A., Najjar, M.B., Mianabadi, M. (2009). Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Sciences*, **9**: 44-45.
383. Sahbaz, R., Lieberei, R., Aniszewski, T. (2009). Polyphenol oxidase (PPO, catecholase) activity during germination and early seedling growth of cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, **82**: 163-169.
384. Sajjadi, S.E, Eskandari, B. (2005). Chemical constituents of the essential oil of *Nepeta oxyodonta*. *Chemistry of Natural Compounds*, **41(2)**: 175-177.
385. Sajjadi, S.E. (2005). Analysis of the essential oil of *Nepeta sintenisii* Bornm. from Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **13(2)**: 61-64.

386. Sajjadi, S.E., Ghassemi, N. (1999). Volatile constituents of *Nepeta glomerulosa* Boiss. subsp. *carmanica*. *Flavour and Fragrance Journal*, **14**: 265-267.
387. Sajjadia, S.E., Khatamsaz, M. (2001). Volatile constituents of *Nepeta heliotropifolia* Lam. *Journal of Essential Oil Research*, **13(3)**: 204-205.
388. Sajjadia, S.E., Mehregan, I. (2005). Chemical constituents of the essential oil of *Nepeta daenensis* Boiss. *Journal of Essential Oil Research*, **17(5)**: 563-564.
389. Sakagami, Y., Kajimura, K. (2002). Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Hospital Infection*, **50(2)**: 140-4.
390. Salehi, P., Sonboli, A., Allahyari, L. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil and various extracts of *Nepeta ispahana* from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **10**: 324-329.
391. Salin, M.L., Bridges, S.M. (1981). Absence of the iron-containing superoxide dismutase in mitochondria from mustard (*Brassica campestris*). *Biochemical Journal*, **195**: 229-233.
392. Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A., Smith, G.C. (2001). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* DT 104, and *Listeria monocytogenes* in fresh meat decontamination at 4 and 10°C. *Journal of Food Protection*, **64(7)**: 950-957.
393. Santos-Gomes, P.C., Fernandes-Ferreira, M. (2003). Essential oils produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51(8)**: 2260-2266.
394. Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Fernandes-Ferreira, M. (2002). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*, **162**: 981-987.
395. Sarahroodi, S., Jafari-Najafi, R., Nasri, S., Rahampur, K., Maleki-Jamshid, A., Esmacili, S. (2012). Effects of *Nepeta menthoides* aqueous extract on retention and retrieval of memory in mice. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **15(22)**: 1085-1089.



396. Sarath, G., Hou, G., Baird, L.M., Mitchell, R.B. (2007). Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C(4)-grasses. *Planta*, **226**: 697-708.
397. Sawai, S., Saito, K. (2011). Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Frontiers in Plant Science*, **2(25)**: 1-8.
398. Saxena, J., Mathela, C.S. (1996). Antifungal activity of new compounds from *Nepeta leucophylla* and *Nepeta clarkei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62(2)**: 702-704.
399. Scandalios, J.G., Guan, L., Polidoros, A.N. (1997). Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. In: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses (Scandalios, J.G. Ed.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 343-406.
400. Scarpati, M.L., Oriente, G. (1958). Isolation and constitution of rosmarinic acid, from *Rosmarinus officinalis*. *Ric. Sci.* **28**: 2329-2333.
401. Schlos, P., Walter, C., Mader, M. (1987). Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotina tabacum* L. *Planta*, **170**: 225-229.
402. Schlüter, D., Chahoud, S., Lassmann, H., Schumann, A., Hof, H., Deckert-Schlüter, M. (1996). Intracerebral targets and immunomodulation of murine *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **55(1)**: 14-24.
403. Schmid, J., Amrhein, N. (1995). The molecular organisation of the shikimate pathway in plants. *Phytochemistry*, **39**: 739-747.
404. Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D. (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**: 36566-36574.
405. Schopfer, P., Plachy, C., Frahry, G. (2001). Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seed controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiology*, **125**: 1591-602.

406. Schultz, G., Simbro, E., Belden, J., Zhu, J., Coats, J. Catnip. (2004). *Nepeta cataria* (Lamiales: Lamiaceae)—a closer look: seasonal occurrence of nepetalactone isomers and comparative repellency of three terpenoids to insects. *Environmental Entomology*, **33**: 1562-1569.
407. Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichganz, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*, **267(16)**: 4904-4911.
408. Schulz, M., Kussmann, F., Knop, M., Kriegs, B., Gresens., F., Eichert, T., Ulbrich, A., Marx., F., Fabricius., H., Goldbach, H., Noga, G. (2007). Allelopathic monoterpenes interfere with *Arabidopsis thaliana* cuticular waxes and enhance transpiration. *Plant Signaling & Behavior*, **2(4)**: 231-239.
409. Sefidkon, F., Dabiri, M., Alamshahi, A. (2002). Analysis of the essential oil of *Nepeta fissa* C.A. Mey from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, **17**: 89-90.
410. Sefidkon, F., Jamzad, Z., Mirza, M. (2006). Chemical composition of the essential oil of five Iranian *Nepeta* species (*N. crispa*, *N. mahanensis*, *N. ispahanica*, *N. eremophila* and *N. rivularis*). *Flavour and Fragrance Journal*, **21**: 764–767.
411. Sefidkon, F., Shaaban, A. (2004). Essential oil composition of *Nepeta meyeri* Benth. from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, **19(13)**: 236-238.
412. Sefidkon, F., Jamzad, Z. (2007). Essential oil composition of four Iranian *Nepeta* Species (*N. cephalotes*, *N. bornmuelleri*, *N. mirzayanii* and *N. bracteata*). *Journal of Essential Oil Research*, **19(3)**: 262-265.
413. Sefidkona, F., Akbarinia, A. (2003). Essential oil composition of *Nepeta pogonosperma* Jamzad et Assadi from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **15(5)**: 327-328.
414. Senatorea, F., Arnoldb, N.A., Piozzic, F. (2005). Composition of the essential oil of *Nepeta curviflora* Boiss. (Lamiaceae) from Lebanon. *Journal of Essential Oil Research*, **17(3)**: 268-270.
415. Sevon, N, Oksman-Caldentey, K.M. (2002). Agrobacterium rhizogenesmediates transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica*, **68**: 859-868.

416. Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**: 67-103.
417. Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53(2)**: 7749-7759.
418. Sheela, C., Ramesh, C. (2011). Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry reviews*, **10**: 371-375.
419. Shinwari, Z.K., Ahmaid, N., Hussain, J., Urrehman, N. (2013). Antimicrobial evaluation and proximate profile of *Nepeta leavigata*, *Nepeta kurramensis* and *Rhynchosia reniformis*. *Pakistan Journal of Botany*, **45(1)**: 253-258.
420. Shu, J.J. (1994). *Nepeta* Linnaeus. *Flora of China* **17**: 107-118.
421. Sikemma, J., de Bont, J.A., Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, **269(11)**: 8022-8028.
422. Simontacchi, M., Caro, A., Fraga, C.G., Puntarulo, S. (1993). Oxidative stress effects, tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination. *Plant Physiology*, **103**: 949-953.
423. Simontacchi, M., Sadvovsky, L., Puntarulo, S. (2003). Profile of antioxidant content upon developing of *Sorghum bicolor* seeds. *Plant Science*, **164**: 709-715.
424. Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, S., Arora, K., Kohli, R.K. (2006a).  $\alpha$ -pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Annals of Botany*, **98**: 1261-1269.
425. Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, S., Kohli, R.K., Arora, K. (2006b). Phytotoxicity of the volatile monoterpene citronellal against some weeds. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **61**: 334-340.
426. Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, S., Ramezani, H., Kohli, R.K. (2002). Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis*. *Annals of Applied Biology*, **141**: 111-116.

427. Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. (2003). Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews Plant Science*, **22**: 239-311.
428. Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. (2004). Allelopathic effect of two volatile monoterpenes against bill goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). *Crop protection*, **21**: 347-350.
429. 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**: 154-162.
430. Skalts, H.D., Lazari, D.M., Loukis, A.E., Constantinidis, T. (2000). Essential oil analysis of *Nepeta argolica* Bory & Chaub. subsp. *argolica* (*Lamiaceae*) growing wild in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, **15(2)**: 96-99.
431. Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1502**: 139-144.
432. Sokolović, M., Šimpraga, B. (2006). Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Control*, **17**: 733-740.
433. Sonboli, A., Gholipour, A., Yousefzadi, M., Mojarrad M. (2009). Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Nepeta menthoides* from Iran. *Natural Product Communication*, **4(2)**: 283-286.
434. Sonboli, A., Salehi, P., Yousefzadi, M. (2004). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. from Iran *Zeitschrift für Naturforschung*, **59c**: 653-656.
435. Soobrattee, M.A, Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*, **579(1-2)**: 200-213.
436. Spero, N.C., Gonzalez, Y.I., Scialdone, M.A., Hallahan, D.L. (2008). Repellency of hydrogenated catmint oil formulations to black flies and mosquitoes in the field. *Journal of Medical Entomology*, **45(6)**: 1080-1086.

437. Sreejayan, N., Rao, M. (1996). Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Drug Research*, **46**: 169-171.
438. Stalikas, C.D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, **30**: 3268-3295.
439. Steer, P., Milligard, J., Sarabi, D.M., Wessby, B., Kahan, T. (2002). Cardiac and vascular structure and function are related to lipid peroxidation and metabolism. *Lipids*, **37**: 231-236.
440. Steffens, J.C. (2000). Acyltransferases in protease's clothing. *Plant Cell*, **12**: 1253-1255.
441. Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D. (1994). Polyphenol oxidase. In Recent advances in phytochemistry. Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism, (Ellis B.E., Kuroki G.W., Stafford H.A., Eds.), Plenum Press, New York. pp. 275-312.
442. Stojanović, G., Radulović, N., Lazarević, J., Miladinović, D., Đoković, D. (2005). Antimicrobial activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, **17**: 587-589.
443. Stone, J.R., Yang, S. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal*, **8**: 243-270.
444. Stout, M.J., Fidantsef, A.L., Duffey, S.S., Bostock, R.M. (1999). Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **54**: 115-130.
445. Strack, D. (1980). Enzymatic synthesis of 1-sinapoylglucose from free sinapic acid and UDP-glucose by a cell-free system from *Raphanus sativus* seedlings. *Zeitschrift für Naturforschung*, **35c**: 204-208.
446. Strack, D. (1981). Sinapine as a supply of choline for the biosynthesis of phosphatidylcholine in *Raphanus sativus* seedlings. *Zeitschrift für Naturforschung*, **36c**: 215-221.
447. Suke, S.O., Dayan F.E. (2006). Modes of action of phytotoxins from plants. In: Allelopathy: A physiological process with ecological implication (Regiosa, M.J., Pedrol, N., Gonzáles, L. Eds.), Springer, Netherlands. pp. 511-536.

448. Sun, W.Q., Leopold, A.C. (1995). The maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiologia Plantarum*, **94**: 94-104.
449. Swarup, V., Ghosh, J., Ghosh, S., Saxena, A., Basu, A. (2007). Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**: 3367-3370.
450. Takahashi, Y., Inaba, N., Kuwahara, S., Kuki, W. (2003). Antioxidative effect of citrus essential oil components on human low-density lipoprotein *in vitro*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **67(1)**: 195-197.
451. Takeda, T., Yokota, A., Shigeoka, S. (1995). Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae. *Plant Cell Physiology*, **36(6)**: 1089-1095.
452. Takeda, Y., Oiso, Y., Masuda, T., Honda, G., Otsuka, H., Sezik, E. (1998). Iridoid and eugenol glycosides from *Nepeta cadmea*. *Phytochemistry*, **49(3)**: 787-791.
453. Takhtajan, A. (2009). *Lamiaceae* In: Flowering plants. Springer-Verlag, Berlin, Hamburg. pp. 511-588.
454. Tanaka, T., Morimoto, S., Nonaka, G., Nishioka, I., Yokozawa, T., Chung, H.Y., Oura, H. (1989). Magnesium and ammonium-potassium lithospermates B, the active principles having a uremia-preventive effect from *Salvia miltiorrhiza*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **37**: 340-344.
455. Tawfik, A.A., Read, P.E., Cuppett, S.L. (1998). *Rosmarinus officinalis* (Rosemary), *in vitro* culture, regeneration of plant, and the level of essential oil and monoterpenoid constituents. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants X.* (ed. Y.P.S. Bajaj). Springer Verlag Berlin Heidelberg.
456. Tepe, B., Daferera, D., Tepe, A.S., Polissiou, M., Sokmen, A. (2007). Antioxidant activity of the essential oil and various extract of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. From Turkey. *Food Chemistry*, **103(4)**: 1358-1364.

457. Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissioud, M., Sokmen, A. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl.). *Food Chemistry*, **84(4)**: 519-525.
458. Thipyapong, P. Steffens, J.C. (1997). Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology*, **115**: 409-418.
459. Thipyapong, P., Hunt, M.D., Steffens, J.C. (1995). Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **40**: 673-676.
460. Toh, S., Imamura, A., Watanabe, A., Nakabayashi, K., Okamoto, M., Jikumaru, Y., Hanada, A., Aso, Y., Ishiyama, K., Tamura, N., Iuchi, S., Kobayash, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Nambara, E., Kawakami, N. (2008). High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology*, **146**: 1368-1385.
461. Tolbert, N.E. (1980). The biochemistry of plants. Academic press: New York **1**: 359-388.
462. Tommasi, F., Paciolla, C., de Pinto, M.C. and De Gara, L. (2001). A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 1647-1654.
463. Toorop, P.E., Aelst, A.C., Hilhorst, H.W.M. (2000). The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. *Journal of Experimental Botany*, **51**: 1371-1379.
464. Topal, S., Kocaçalışkan. I. (2006). Allelopathic effects of dopa against four weed species. *DPU Fen Institute of science*, **11**: 27-32.
465. Topçu, G., Kökdil G., Yalçın S.M. (2000). Constituents of *Nepeta caesarea*. *Journal of Natural Products*, **63(6)**: 888-890.

466. Trute, A., Nahrstedt, A., (1986). Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix* L. *Phytochemical Analysis*, **7**: 204-208.
467. Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., Noguchi, K., Ishiyama, M., Ezoe, T. (2012). Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *Journal of Microbiologic Methods*, **90**: 160-166.
468. Tundis, R., Nadjafi, F., Menichini, F. (2012). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant properties of *Nepeta crassifolia* Boiss & Buhse and *Nepeta binaludensis* Jamzad. *Phytotherapy Resesearch*, DOI: 10.1002/ptr.4757.
469. Turina, A.V., Perillo, M.A. (2003). Monoterpenes affect chlorodiazepoxide–micelle interaction through micellar dipole potential modifications. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1616**: 112-120.
470. Turner, C. (1976). Genus *Nepeta*, Flora Europea, Tome III. (Tutin, T., Heywood, G., Burges, N.A., Valentine, D.M., Walters, S.M., Webb D. Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp: 158-160.
471. Tuteja, N., Singh, M.B., Misra, M.K., Bhalla, P.L., Tuteja, R. (2001). Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **36**: 337-397.
472. Tzagoloff, A. (1963). Metabolism of sinapine in mustard plants. I. Degradation of sinapine into sinapic acid and choline. *Plant Physiology*, **38**: 202-206.
473. Uchida, K. (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, **28**: 1685-1696.
474. Uesato, S., Ikeda, H., Fujita, T., Inouye, H., Zenk, M.H. (1987). Elucidation of iridodial formation mechanism. Partial purification and characterization of the novel monoterpene cyclase from *Rauwolfia serpentina* cell suspension culture. *Tetrahedron Letters*, **28**: 4431-4434.



475. van Acker, S.A., van den Berg, D.J., Tromp, M.N., Griffaen D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20(3)**: 331-342.
476. Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylstek, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlotz, H.K., Zabeau, M., Montagu, M.V., Inze, D., Breusegem, F.V. (2004). Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **39**: 45-58.
477. Vardhini B.V., Rao S.R. (2003). Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regulation*, **41**: 25-31.
478. Vaughan, M.A., Vaughn, K.C. (1988). Mitotic disrupters from plants and their potential uses as herbicides. *Weed Technology*, **2**: 533-539.
479. Veitch, N.C. (2004). Structural determination of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews*, **3**: 3-18.
480. Verdeguer, M., Blázquez, M.A., Boira, H. (2009). Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriosephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology*, **37**: 362–369.
481. Voegelé, A., Linkies, A., Müller, K., Metzger, G. (2011). Members of the gibberellin receptor gene family *GID1* (Gibberellin insensitive *DWARF1*) play distinct role during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Journal of Experimental Botany*, **62(14)**: 5131-5147.
482. Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, **3**: 2-20.
483. Wagner, K.H., Elmadfa, I. (2003). Biological relevance of terpenoids-overview focusing on mono-, di and tetraterpenes. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **47**: 95-106.
484. Waller, G.R. (1989). Allelochemical action of some natural products. In *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allomones*. (Chou C.H., Waller G.R. Eds.). Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 9, Taipei, Taiwan. pp. 129-154.

485. Wang, W.B., Kim, Y.H., Lee, H.S., Kim, K.Y., Deng, X.P., Kwak, S.S. (2009). Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**: 570–577.
486. Wang, Z., Chen, Y., Cun, L. (2007). Differences in biological responses to cold stress in two contrasting varieties of rape seeds (*Brassica napus* L.). *Forestry Studies in China*, **9(2)**: 142-146.
487. Webb, C.E., Russell R.C. (2007). Is the extract from the plant catmint (*Nepeta cataria*) repellent to mosquitoes in Australia? *Journal of the American Mosquito Control Association*, **23(3)**: 351-354.
488. Weidenbörner, M., Hindorf, H., Jha, H.C., Tsotsonos, P. (1990). Antifungal activity of flavonoids in against storage fungi of genus *Aspergillus*. *Phytochemistry*, **29**: 1103-1105.
489. Weidenbörner, M., Hindorf, H., Jha, H.C., Tsotsonos, P., Egge, H. (1989). Antifungal activity of isoflavonoids against storage fungi of genus *Aspergillus*. *Phytochemistry*, **28**: 3331-3319.
490. Weidenbörner, M., Jha, H.C. (1994). Fungicidal activity of flavonoids mixtures against grain contaminating fungi. *Medical Faculty, Landbouw Universiteit Gent*, **59(3a)**: 1107-1022.
491. Weir, T.L., Park, S., Vivanco, J.M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Plant biology*, **7**: 472-479.
492. Weitbrecht, K., Müller, K., Leubner-Metzger, K. (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, **62(10)**: 3289-3309.
493. Welinder, K.G., Gajhede, M. (1992). Structure and evolution of peroxidase. In: Plant peroxidases. Biochemistry and physiology (Welinder, K.G., Rasmussen, S.K., Penel, C., Greppin, H. Eds.), Rochat-Baumann, Inprimerie Nationale, Geneva, pp. 35-42.
494. Wells, J.M., Butterfield, J.E. (1997). *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace. *Plant Disease*, **81(8)**: 867-872.

495. Weston, L.A. (1996). Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy Journal*, **88(6)**: 860-866.
496. Weston, L.A., Duke, S.O. (2003) Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews Plant Science*, **22**: 367-389.
497. Whitaker, J.R. (1996). Polyphenol oxidase. In: Food Chemistry, (Fennema, O.R. Ed.). Marcel Dekker, New York. pp. 492-494.
498. Wichi, H.C. (1986). Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*, **24**: 1127-1130.
499. Wiseman, H., Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, **313**: 17-29.
500. Wojtyla, L., Garnczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L., Jurga, S. (2006). A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal of Plant Physiology*, **163**: 1207-1220.
501. Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahman, M.A. (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry*, **44(1)**:301-305.
502. Woodstock, LW. (1988). Seed imbibition: a critical period for successful germination. *Journal of Seed Technology*, **12**: 1-15.
503. Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, **123(6)**: 1173-1183.
504. Wu, H., Pratley, J., Lemerle, D., Haig, T. (1999). Crop cultivars with allelopathic capability. *Weed Research*, **39**: 171-180.
505. Wyk, B.E.V., Wink, M (2004). Medicinal plants of the world. *Pretoria, Briza*.

506. Xi, D.M., Liu, W.S., Yang, G.D., Wu, C.A., Zheng, C.C. (2010). Seed-specific overexpression of antioxidant genes in *Arabidopsis* enhances oxidative stress tolerance during germination and early seedling growth. *Plant Biotechnology Journal*, **8**: 796-806.
507. Xu, S., Li, J.L., Zhang, X.Q., Wei, H., Cui, L.J. (2006). Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turf grass species under heat stress. *Environmental and Experimental Botany*, **56**: 274-285.
508. Xuan, T.D., Shinkichi, T., Khanh, T.D., Min, C.I. (2005). Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. *Crop Protection*, **24**: 197-206.
509. Yang, F., Basu, T.K., Oraikul, B. (2001). Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **52**: 319-330.
510. Yang, R., Shetty, K., (1998). Stimulation of rosmarinic acid in shoot cultures of oregano (*Origanum vulgare*) clonal line in response to proline, proline analogue, and proline precursor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46(7)**: 2888-2893.
511. Yang, Y.S, Futsuhara, Y. (1991). Inhibitory effects of volatile compounds released from rice callus on soybean callus growth: allelopathic evidence observed using *in vitro* cultures. *Plant Science*, **77(1)**: 103-110.
512. Yazici, S.O., Özmen, I., Celkoglu, U., Ölüzcel, H., Genc, H. (2012). *In vitro* antioxidant activities of extracts from some *Nepeta* species. *International Journal of Health & Nutrition*, **3(1)**: 8-12.
513. Yu, F., Utsumi, R. (2009). Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**: 3049-3052.
514. Zamfirache, M.M., Burzo, I., Padurariu, C., Boz, I., Andro, A.R., Badea, L.M., Oltanu, Z., Lamban, C., Truta E. (2010). Studies regarding the chemical composition of volatile oils from some spontaneous and cultivated *Lamiaceae* species. *Biologie vegetală*, **56**: 43-49.

515. Zenasni, L., Bouidida, H., Hancali, A., Boudhane, A., Abdelkader, H.A., Idrissi, I., Aouad, R., Bakri, Y., Benjouad, A. (2008). The essential oils and antimicrobial activity of four *Nepeta* species from Morocco. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2(5)**: 111-114.
516. Zhang, J., Kirkham, M.B. (1994). Drought stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant & Cell Physiology*, **35(5)**: 785-791.
517. Zunino, M.P., Zygadlo, J.A. (2004). Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. *Planta*, **219**: 303-309.
518. Zuzarte, M.R., Dinis, A.M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L.R., Canhoto, J.M. (2010). Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, **32**: 580-587.
519. Zwenger, S., Basu, C. (2008). Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **3(1)**: 1-7.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Jasmina M. Nestorović Živković rođena je 24. marta 1981. godine u Beogradu. Osnovnu školu završila je u Novim Banovcima, a srednju školu u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2000/2001. godine na studijskoj grupi Biologija. Fakultet je završila 2006. godine sa prosečnom ocenom 8,78. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u okviru studijskog programa Eksperimentalna i primenjena botanika upisala je školske 2006/2007. godine.

Od februara 2007. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. U zvanje istraživač saradnik izabrana je februara 2010. godine.

Trenutno je Jasmina M. Nestorović Živković angažovana na dva nacionalna projekta Ministarstva prosvete i nauke republike Srbije „Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju *ex situ* zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja“ (ON173024) kao i na projektu „Primena niskotemperaturnih plazmi u biomedicini, zaštiti čovekove okoline i nanotehnologijama“ (III41011). U prethodnom periodu Jasmina M. Nestorović Živković je bila angažovana na dva nacionalna projekta: „Svetlosna i hormonalna kontrola rasteња i razvića biljaka, razmnožavanje *in vitro* i *ex situ* zaštita retkih i ugroženih vrsta“ br. 143031B (2006-2010) i „Primena plazma igle u medicinskim i biološkim istraživanjima i brza i pouzdana detekcija volatilnih supstanci humanog i biljnog porekla“, br. TP-23016A (2009-2010). U predhodnom periodu Jasmina M. Nestorović Živković je bila angažovana i na jednom međunarodnom projektu „*Plant Terpenoids for Human Health: a chemical and genomic approach to identify and produce bioactive compounds*“ (Grant Agreement No. 227448) FP7.

Dobitnik je nagrade za najbolji poster na međunarodnom simpozijumu „*New Research in Biotechnology*“, 2009.

Jasmina M. Nestorović Živković je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije i Evropskog društva za biljnu biologiju (*FESPB*).