

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

mr Marijana V. Skorić

**Regulacija produkcije labdanskih
diterpena u kulturi *in vitro*
Cistus creticus L. i analiza njihove
biološke aktivnosti**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

MSc Marijana V. Skorić

**Regulation of labdane diterpenes
production in *Cistus creticus* L.
in vitro culture and analysis of their
biological activity**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentori:

Naučni saradnik dr Slađana Todorović

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

Vanredni profesor dr Aneta Sabovljević

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Članovi komisije:

Viši naučni saradnik dr Jasmina Glamočlija

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

Viši naučni saradnik dr Ana Simonović

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“, laboratorijama Instituta za proučavanje lekovitog bilja „ Josif Pančić“, laboratorijama Odeljenja za fiziku životne sredine Instituta za fiziku, Univerziteta u Beogradu, kao i u laboratorijama Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. 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 svojim dragim mentorima dr Slađani Todorović i prof. dr Aneti Sabovljević na strpljenju i velikoj podršci tokom izrade doktorske disertacije. Neizmerno vam hvala na uloženom trudu, stručnoj pomoći, interesantnim idejama i smernicama, kao i na pozitivnoj energiji. Veliku zahvalnost dugujem dr Jasmini Glamočliji na angažovanju u realizaciji eksperimenata iz oblasti antimikrobnog dejstva, na pomoći u tumačenju i prezentovanju rezultata, ali i na predusretljivosti i uvek pozitivnoj atmosferi. Posebnu zahvalnost dugujem dr Ani Simonović za veliko angažovanje u realizaciji eksperimenata iz oblasti molekularne biologije, za veliku pomoć oko uobličavanja teksta, kao i na prenesenom znanju.

Izuzetnu zahvalnost dugujem mr Mihailu Ristiću iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Josif Pančić“ na realizaciji eksperimenata iz oblasti fitohemijskih GC-MS i GC-FID analiza, na uloženom trudu i nesebičnoj pomoći, kao i na dragocenom znanju. Njegova stručna pomoć i korisni saveti bili su mi od neprocenjive vrednosti tokom svih faza izrade disertacije. Hvala vam od srca! Posebnu zahvalnost upućujem prof. dr Veletu Teševiću sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na velikoj pomoći u realizaciji i tumačenju rezultata hemijskih analiza ekstrakata trihoma.

**Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Angelosu K. Kanellisu na izuzetnoj inspiraciji koju mi je podario prema radu sa *Cistus creticus* L. Njegove konstruktivne sugestije i preneseno znanje neprocenjivo su iskustvo.*

Svojim kolegama sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije dr Nevenki Gligorijević, dr Radmili Janković i dr Siniši Raduloviću zahvaljujem se na uspešnoj saradnji i na angažovanju prilikom analize citotoksične aktivnosti. Takođe veliko hvala

kolegama sa Instituta za fiziku, dr Neveni Puač i dr Andreji Stojić, na velikoj pomoći u tumačenju i predstavljanju rezultata PTR-MS analiza. Posebnu zahvalnost dugujem dr Ivani Momčilović na velikoj pomoći u eksperimentalnoj fazi rada prilikom analize ekspresije proteina, kao i na veoma korisnim diskusijama. Mojim dragim citolozima dr Snežani Budimir, dr Branki Uzelac i dr Dušici Janošević se zahvaljujem na angažovanju oko histocitoloških istraživanja, a mojoj dr Suzani Živković na pomoći u analizi fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti. Veliko hvala i Urošu Gašiću sa Hemijskog fakulteta na realizaciji UHPLC/LTQ - OrbiTrap MS analiza. Zahvalnost u realizaciji eksperimenata antimikrobne aktivnosti dugujem i dr Marini Soković. Hvala vam svima na svesrdnoj podršci.

Neizmernu zahvalnost dugujem svom bivšem dugogodišnjem šefu i profesoru dr Dragoljubu Grubišiću, velikom čoveku i naučniku koji na veliku žalost nije više sa nama. Veliko vam hvala na podršci tokom svih godina. Veliko hvala i mom profesoru dr Radomiru Konjeviću, koji takođe nije sa nama. Bila mi je čast i zadovoljstvo poznavati takve ljude i blisko sarađivati sa vama.

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 dr Danijeli Mišić (mom dragom sadašnjem šefu), dr Branislavu Šileru, dr Jeleni Savić, dr Slavici Dmitrović, Ghalawenji Nabilu, Milici Milutinović, dr Dragani Božić, dr Jasmini Nestorović Živković, Tijani Banjanac, dr Milanu Dragičeviću i Milici Bogdanović. Vama, kao i Nedi Aničić i Jeleni Boljević hvala na pozitivnoj energiji i podršci u trenucima kada je bilo najteže.

Hvala i svim mojim prijateljima koji su bili uz mene.

Mojim roditeljima, Radmili i Vojislavu, kao i bratu Milovanu i njegovoj porodici, veliko hvala na svojoj ljubavi, podršci i poverenju koje su mi tokom čitavog života pružali.

Svojoj ćerki Jovani, sinu Luki i mužu Stefanu povećujem ovu disertaciju kao izraz najdublje zahvalnosti za svu beskrajnu ljubav i razumevanje...

** I would like to express my great appreciation to prof. dr. Angelos K. Kanellis for the extraordinary inspiration he gave to me for working with *Cistus creticus* L. His constructive suggestions and knowledge were an invaluable experience.*

Regulacija produkcije labdanskih diterpena u kulturi *in vitro* *Cistus creticus* L. i analiza njihove biološke aktivnosti

REZIME

Cistus creticus L. je višegodišnja, žbunasta biljka koja nastanjuje suva i topla područja Mediterana. Smolu ove vrste lokalno stanovništvo Krita sakuplja od davnina zbog izraženih aromatičnih i lekovitih svojstava. Dominantna biološki aktivna komponenta smole i izdanaka ove biljke su labdanski diterpeni, dok je koren biljke još uvek nepoznatog sastava. U cilju iznalaženja optimalnih uslova za produkciju labdanskih diterpena predmet istraživanja ove disertacije bio je ispitivanje regulacije produkcije labdanskih diterpena u biljkama *C. creticus* gajenim *in vitro* pod uticajem različitih abiotičkih faktora i hranljivih podloga sa varirajućim sadržajem različitih šećera. Uspešno je uspostavljena *in vitro* kultura biljaka *C. creticus* na MS medijumu bez fitohormona, pri čemu parametri rastenja i razvića eksplantata nisu pokazali značajne razlike između ispitivanih klonova. Optimalne koncentracije ugljenih hidrata za rastenje i razviće biljaka *C. creticus* u uslovima *in vitro* su od 0,03 M do 0,1 M saharoze i glukoze. Histoemijskim analizama listova izdanaka gajenih *in vitro* je utvrđeno da kapitatne glandularne trihome tipa II *C. creticus* predstavljaju mesto akumulacije labdanskih diterpena i fenolnih jedinjenja. Genetička transformacija *C. creticus* je izvršena pomoću *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS, pri čemu je uspostavljena kultura transformisanih korenova.

Fitoemijska karakterizacija biljaka *C. creticus* gajenih *in vitro*, omogućila je identifikaciju i kvantifikaciju glavnih grupa sekundarnih metabolita (terpena i fenolnih jedinjenja) koji se u ovim uslovima produkuju. Labdanski diterpeni su dominantna jedinjenja u izdancima biljaka *C. creticus* gajenim *in vitro*, a među njima su najzastupljeniji labd-7,13-dien-15-ol i labd-7,13-dien-15-ol acetat. Od isparljivih sekundarnih metabolita najzastupljeniji su monoterpeni i seskviterpeni. U dihlormetanskim ekstraktima eksudata kapitativnih trihoma tipa II najzastupljenije jedinjenje je labd-7,13-dien-15-ol acetat. U korenovima *C. creticus* potvrđeno je prisustvo fenolnih jedinjenja i masnih kiselina, dok labdanski diterpeni nisu detektovani. Analiza sadržaja fenolnih jedinjenja ukazala je da su u etanolnim ekstraktima izdanaka

i korenova prisutna fenolna jedinjenja kao što su hininska kiselina, galokatehin i katehin.

Nivo ekspresije odabranih gena koji učestvuju u MEP i MVA biosintetskom putu se povećavao nakon povrede biljaka gajenih *in vitro*, ali u ovom periodu nije zabeležena promena u relativnoj količini labdanskih diterpena. Tokom procesa dehidratacije uočeno je značajno smanjenje nivoa ekspresije gena koji su uključeni u MEP i MVA biosintetski put, dok se u procesu rehidratacije nivo ekspresije vratio na kontrolni nivo. Tokom procesa dehidratacije/rehidratacije u uslovima *in vitro* nisu uočene promene u relativnoj količini labdanskih diterpena. Trend povećanja relativnog sadržaja labdanskih diterpena je uočen u izdancima gajenim na medijumu sa 0,1 M saharozom ili 0,1 M glukozom. Uzimajući u obzir i parametre rastenja i razvića optimalna podloga u smislu najbolje produkcije labdanskih diterpena je MS podloga sa dodatkom 0,1 M glukoze.

Analizirana je biološka aktivnost etanolnih ekstrakata izdanaka, transformisanih i netransformisanih korenova dobijenih u kulturi *in vitro*. Antioksidativni potencijal ekstrakata izdanaka i korenova je bio zadovoljavajući i u skladu sa količinom ukupnih fenola i flavonoida u njima. Etanolni ekstrakti izdanaka i korenova *C. creticus* su pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost prema osam vrsta bakterija i sedam vrsta gljiva, a aktivnost potiče od labdanskih diterpena i fenolnih jedinjenja. Etanolni ekstrakti izdanaka *C. creticus* su pokazali citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama kancera cerviksa, kao i prema ćelijama kancera dojke (MDA-MB-453) i melanoma (FemX). Pokazana citotoksična aktivnost može se pripisati labdanskim diterpenima prisutnim u ekstraktu izdanaka.

Ključne reči: *Cistus creticus* L., labdanski diterpeni, *in vitro* kultura, fenolna jedinjenja, MVA i MEP biosintetski put, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost, citotoksična aktivnost

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

UDK broj: 581.1:582.6(043.3)

Regulation of labdane diterpenes production in *Cistus creticus* L. *in vitro* culture and analysis of their biological activity

ABSTRACT

Cistus creticus L. is a perennial, bushy plant that inhabits mainly dry and warm areas of the Mediterranean. The resin of this species has been actively collected by the local inhabitants of Crete since ancient times due to its aromatic and medicinal properties. The predominant bioactive component of the resin and the shoots of this plant are labdane diterpenes, while the chemical composition of the roots is still unknown. In order to find the optimal conditions for the labdane diterpenes production, the subject of this thesis was to investigate the regulation of labdane-type diterpenes production in *in vitro* grown plants of *C. creticus*, as influenced by various abiotic factors and growth media with varying content of different carbohydrates. *In vitro* culture of *C. creticus* was successfully established on hormone-free MS medium, and the parameters of growth and development of explants showed no significant differences among analyzed clones. Optimal concentrations of carbohydrates for *in vitro* growth and development of *C. creticus* ranged from 0.03 M to 0.1 M sucrose or glucose. Genetic transformation of *C. creticus* was performed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS and the culture of transformed roots was established. Regeneration of transformed plants was unsuccessful. Histochemical analysis of the leaves from *in vitro* cultured *C. creticus* shoots showed that labdane diterpenes and phenolic compounds accumulate in the type II capitate glandular trichomes.

Phytochemical characterization of *in vitro* grown *C. creticus* has enabled the identification and quantification of two major groups of secondary metabolites (terpenes and phenols), which are produced under these conditions. Predominant compounds accumulating in shoots of *C. creticus* grown *in vitro* were labdane diterpenes, the most abundant among them being labd-7,13-diene-15-ol and labd-7,13-dien-15-ol acetate. Amongst the volatile secondary metabolites, the most abundant were monoterpenes and sesquiterpenes. Labd-7,13-dien-15-ol acetate was the most abundant compound in dichloromethane extracts of type II capitate trichomes exudates. In the roots of *C. creticus*, the presence of the phenolic compounds and fatty acids was determined,

whereas labdane diterpenes were not detected. Analysis of the phenolic compounds content in the ethanol extracts of shoots and roots indicated presence of compounds such as quinic acid, galocatechin, and catechin.

Expression levels of selected genes involved in the MEP and MVA biosynthetic pathway increased after wounding of *in vitro* grown plants, but there was no change in the relative amount of labdane diterpenes. During the dehydration process, a significant reduction in the expression levels of genes involved in the MEP and MVA biosynthetic pathway was observed, whereas in the process of rehydration their expression returned to control levels. During *in vitro* process of dehydration/rehydration, no change in the relative amount of labdane diterpene was observed. An increasing trend of labdane-type diterpenes relative content was observed in shoots cultured on medium containing 0.1 M sucrose or 0.1 M glucose. Considering the optimal growth parameters, the best medium for labdane diterpene production was MS medium supplemented with 0.1 M glucose.

Biological activity of ethanol extracts of shoots, transformed and non-transformed roots obtained from *in vitro* culture was analyzed. Antioxidant potential of shoot and root extracts was satisfactory and in accordance with the amount of phenolics and flavonoids. Ethanol extracts of shoots and roots of *C creticus* exhibited significant antimicrobial activity against eight bacterial species and seven fungal species, and this activity originated from labdane diterpenes and phenolics. Ethanol extracts of *C. creticus* shoots also exhibited cytotoxic activity against HeLa (cervix), MDA-MB-453 (breast) and FemX (melanoma) cancer cells. Demonstrated cytotoxic activity can be attributed to the labdane diterpenes present in the shoot extract.

Keywords: *Cistus creticus* L., labdane diterpenes, *in vitro* culture, phenolic compounds, MVA and MEP biosynthetic pathway, antioxidant activity, antimicrobial activity, cytotoxic activity

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant physiology

UDC number: 581.1:582.6(043.3)

SADRŽAJ

	strana
SKRAĆENICE	
1. UVOD	1
1.1. Sekundarni metaboliti biljaka	1
1.1.1. Terpeni	2
1.1.1.1. Labdanski diterpeni	4
1.1.2. Biosinteza terpena	5
1.1.2.1. Biosinteza labdanskih diterpena	7
1.1.3. Fenolna jedinjenja	9
1.1.4. Biosinteza fenolnih jedinjenja	10
1.2. Produkcija sekundarnih metabolita u kontrolisanim uslovima	11
1.2.1. <i>In vitro</i> kultura biljaka	12
1.2.2. Regulatorna uloga ugljenih hidrata	13
1.2.3. Genetička transformacija pomoću <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	15
1.2.4. Abiotički stres – fiziološki značaj i uticaj na produkciju sekundarnih metabolita	17
1.2.4.1. Povreda	20
1.2.4.2. Vodni stres	22
1.2.4.3. Produkcija sekundarnih metabolita i abiotički stres	23
1.3. Biološka aktivnost sekundarnih metabolita	26
1.3.1. Antimikrobna aktivnost	26
1.3.2. Antioksidativna aktivnost	29
1.3.3. Antikancerogena aktivnost	31
1.3.4. Biološka aktivnost labdanskih diterpena	33
1.4. Opšte odlike vrste <i>Cistus creticus</i> L.	35
2. CILJ	37
3. MATERIJAL I METODE	38
3.1. Biljni materijal	38

3.2. <i>In vitro</i> kultura <i>Cistus creticus</i>	38
3.3. Eksperimentalni dizajn	39
3.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija	40
3.5. Histološke analize	41
3.5.1. Histoanatomska analiza korenova	41
3.5.2. Histochemijska karakterizacija trihoma	41
3.6. Genetička transformacija <i>C. creticus</i>	42
3.6.1. Transformacija i uspostavljanje kultura transformisanih korenova	42
3.6.2. Histochemijski test za određivanje aktivnosti enzima β -glukuronidaze	42
3.6.3. Karakterizacija rasta transformisanih korenova	43
3.6.4. Indukcija regeneracije pupoljaka na transformisanim korenovima	44
3.6.5. Molekularna karakterizacija transformisanih korenova	44
3.7. Analiza ekspresije gena koji učestvuju u biosintetskom putu terpena	47
3.7.1. Izolacija RNK	47
3.7.2. Tretman dezoksiribonukleazom	48
3.7.3. Reverzna transkripcija	48
3.7.4. PCR amplifikacija	49
3.7.5. Pripremanje standarda za apsolutnu kvantifikaciju prečišćavanjem PCR produkata sa gela	50
3.7.6. Kvantitativni PCR (qPCR)	52
3.8. Ekstrakcija i imunodetekcija proteina	53
3.8.1. Ekstrakcija proteina	53
3.8.2. SDS-PAGE elektroforeza i imunodetekcija proteina	54
3.9. Fitochemijske analize	55
3.9.1. Analiza isparljivih jedinjenja u kulturi <i>in vitro</i> <i>C. creticus</i>	55
3.9.1.1. GC-MS analiza (gasna hromatografija sa masenom spektrometijom) korišćenjem <i>headspace</i> tehnike	55
3.9.1.2. PTR-MS (eng. <i>Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry</i>) analiza	55
3.9.2. Analiza etanolnih i dihlormetanskih ekstrakata <i>C. creticus</i> iz <i>in vitro</i> kulture	56
3.9.2.1 Priprema uzoraka	56

3.9.2.2. GC-MS i GC-FID analiza (gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom i gasna hromatografija sa plameno jonizujućim detektorom)	56
3.9.3. Određivanje ukupnog sadržaja fenola i flavonoida u etanolnim ekstraktima <i>C. creticus</i>	57
3.9.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje količine ukupnih fenola	57
3.9.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje količine ukupnih flavonoida	58
3.9.3.3. UHPLC / LTQ - OrbiTrap MS analiza (Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom sa hibridnim masenim spektrometrom LTQ Orbitrap XL)	58
3.10. Ispitivanje biološke aktivnosti etanolnih ekstrakta <i>C. creticus</i>	59
3.10.1. Priprema uzoraka	59
3.10.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti	59
3.10.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	60
3.10.3.1. Testirani organizmi	60
3.10.3.2. Priprema kultura testiranih mikroorganizama	61
3.10.3.3. Metoda mikrodilucije	62
3.10.4. Ispitivanje citotoksične aktivnosti	63
3.10.4.1. Čelijska kultura	63
3.10.4.2. Ispitivanje citotoksičnosti	63
3.10.4.3. Morfološka analiza tretiranih ćelija	64
3.11. Statistička analiza podataka	64
4. REZULTATI	65
4.1. <i>In vitro</i> kultura <i>Cistus creticus</i> L.	65
4.1.1. Morfološki parametri	65
4.2. Fitohemijske analize <i>C. creticus</i> gajenih <i>in vitro</i>	67
4.2.1. Analiza isparljivih jedinjenja u atmosferi <i>in vitro</i> kultura <i>C. creticus</i>	67
4.2.2. Analiza hemijskog sastava biljaka <i>C. creticus</i> gajenih u kulturi <i>in vitro</i>	71
4.3. Analiza trihoma biljaka <i>C. creticus</i> gajenih <i>in vitro</i>	74
4.3.1. Morfološka analiza trihoma	74
4.3.2. Histoheimska analiza trihoma	75
4.3.3. GC-MS i GC-FID analiza kapitatnih trihoma tipa II	78

4.4. Efekat različitih vrsta ugljenih hidrata na rastenje i razviće biljaka <i>C. creticus</i> u kulturi <i>in vitro</i>	79
4.5. Uticaj dehidracije i rehidracije na kulture <i>C. creticus</i> gajene <i>in vitro</i>	83
4.5.1. Promene u morfologiji i relativnom sadržaju vode u listovima <i>C. creticus</i> tokom ciklusa dehidracije/rehidracije	83
4.5.2. Promene u ekspresiji dehidrina na proteinskom nivou tokom ciklusa dehidracije/rehidracije	85
4.6. Produkcija labdanskih diterpena u izdancima <i>C. creticus</i> gajenih <i>in vitro</i>	87
4.6.1. Ekspresija gena koji učestvuju u biosintezi terpena u izdancima <i>C. creticus</i>	87
4.6.1.1. Efekat ugljenih hidrata na ekspresiju gena koji učestvuju u MVA i MEP biosintetskom putu	90
4.6.1.2. Efekat povrede na ekspresiju gena koji učestvuju u MVA i MEP biosintetskom putu	92
4.6.1.3. Efekat procesa dehidracije/rehidracije na ekspresiju gena koji učestvuju u MVA i MEP biosintetskom putu	93
4.6.2. Sadržaj labdanskih diterpena u izdancima <i>C. creticus</i> gajenih <i>in vitro</i>	95
4.7. Genetička transformacija <i>C. creticus</i> pomoću <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	98
4.7.1. Histohemijska i PCR analiza transformisanih korenova	100
4.7.2. Rast transformisanih korenova u kulturi <i>in vitro</i>	101
4.7.3. Indukcija regeneracije	101
4.7.4. Ekspresija gena i sadržaj diterpena labdanskog tipa u transformisanim korenovima i kalusima	102
4.8. Analiza biološke aktivnosti etanolnih ekstrakata <i>C. creticus</i>	104
4.8.1. GC-MS i GC-FID analiza etanolnih ekstrakata	104
4.8.2. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida	106
4.8.3. Antioksidativna aktivnost	110
4.8.4. Antimikrobna aktivnost	111
4.8.5. Citotoksična aktivnost	115
5. DISKUSIJA	118
5.1. <i>In vitro</i> kultura <i>C. creticus</i> – uspostavljanje, hemijska karakterizacija i značaj	118

5.1.1. Efekat ugljenih hidrata na rastenje i razviće <i>C. creticus</i> u uslovima <i>in vitro</i>	120
5.1.2. Hemijska karakterizacija <i>in vitro</i> kulture <i>C. creticus</i>	121
5.1.3. Genetička transformacija <i>C. creticus</i>	126
5.2. Regulacija produkcije labdanskih diterpena u uslovima <i>in vitro</i>	129
5.2.1. Efekat procesa dehidratacije /rehidratacije na regulaciju produkcije labdanskih diterpena u izdancima <i>C. creticus</i> gajenih <i>in vitro</i>	130
5.2.2. Efekat povrede na regulaciju produkcije labdanskih diterpena u izdancima <i>C. creticus</i> gajenih <i>in vitro</i>	135
5.2.3. Efekat ugljenih hidrata na regulaciju produkcije labdanskih diterpena u izdancima <i>C. creticus</i> gajenih <i>in vitro</i>	137
5.3. Analiza biološke aktivnosti etanolnih ekstrakata <i>C. creticus</i> sa osvrtom na značaj labdanskih diterpena	139
5.3.1. Antioksidativna aktivnost	139
5.3.2. Antimikrobna aktivnost	141
5.3.3. Citotoksična aktivnost	145
6. ZAKLJUČCI	149
7. LITERATURA	152
BIOGRAFIJA AUTORA	207
Prilog 1 - Izjava o autorstvu	
Prilog 2 - Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije	
Prilog 3 - Izjava o korišćenju	

SKRAĆENICE

2,4-D - 2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina

ABA - abscisinska kiselina

BAP - 6 -benzilaminopurin

cDNK - komplementarni lanac DNK

CLS - kopal-8-ol difosfat sintaza

CMK - 4-citidin 5' - difosfo-2-C-metil-D-eritrol kinaza

CPP - kopalil difosfat

CPS - kopalil difosfat sintaza

CTAB - heksadecil-3-metil-amonijum-bromid (eng. *cetyltrimethylammonium bromide*)

DEPC - dietil dikarbonat (eng. *diethylpyrocarbonate*)

diTPS - diterpenske sintaze

DMAPP - dimetilalil difosfat

DMSO - dimetil sulfoksid

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

DPPH - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

DXR - 1-deoksi-D-ksiluloza 5-fosfat reduktiozomeraza

DXS - 1-deoksi-D-ksiluloza 5-fosfat sintaza

EDTA - etilendiamintetrasirćetna kiselina

FAO - Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija

FPP - farnezil difosfat

FPPS - farnezildifosfat sintaza

GC-FID - gasna hromatografija sa plameno jonizujućim detektorom

GC-MS - gasna hromatografija sa masenom spektrometijom

GGPP - geranilgeranil difosfat

GGPPS - geranilgeranil difosfat sintaza,

GPP - geranil difosfat

GPPS - geranil difosfat sintaza

GUS - β -D-glukuronidaza

HMGR - HMG-CoA reduktaza

HSP - proteini toplotnog šoka (eng. *heat shock proteins*)

IAA - indol-3-sirćetna kiselina
IBA - indol-3-buterna kiselina
IPP - izopentenil difosfat
IPPI - izopentil difosfat izomeraza
KGT - kapitatne glandularne trihome
KIN - kinetin – 6-furfuril-aminopurin
LD - labdanski diterpeni
LEA proteini - proteini koji se nakupljaju u kasnoj embriogenezi
MBC - minimalna baktericidna koncentracija
MEP - metileritritol fosfatni biosintetski put
MFC - minimalna fungicidna koncentracija
MIC - minimalna inhibitorna koncentracija
MS - hranljiva podloga po Murashige i Skoog-u (1962)
MTS - mehaničke trihome stelatnog tipa
MVA - mevalonatni biosintetski put
NAA - α -naftalen sirćetna kiselina
PCR - reakcija lančanog umnožavanja, (eng. *polymerase chain reaction*)
PEG 8000 - polietilen glikol 8000
PEP - fosfoenolpiruvat
qPCR - kvantitativni PCR
RNK - ribonukleinska kiselina
ROS - reaktivne vrste kiseonika
RT - reverzna transkripcija
RWC - relativni sadržaj vode
SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija
SnRK1 - protein kinaza srodna SNF-1
SRB - sulforodamin B
T-DNK - deo plazmidne DNK koji se integriše u biljni genom (eng. *transferred DNA*)
TDZ - tidiazuron, 1-fenil-3-tidiazol-5-urea
TPS - terpenske sintaze
UH - ugljeni hidrati
VOC - isparljiva organska jedinjenja

1. UVOD

1.1. Sekundarni metaboliti biljaka

Biljke proizvode primarne i sekundarne metabolite koji imaju širok spektar funkcija. U primarne metabolite spadaju jedinjenja kao što su šećeri, nukleotidi, aminokiseline, masne kiseline i polimeri koji nastaju iz pomenutih molekula, a deo su primarnog metabolizma (Nešković i sar., 2003). Procesi primarnog metabolizma se odvijaju istim mehanizmima u svim biljkama i njima nastaju, transformišu se i razgrađuju osnovna gradivna jedinjenja koja ujedno obezbeđuju energiju za rastenje, razviće, funkcionisanje i reprodukciju živog organizma. Procesi sekundarnog metabolizma se samo delom mogu generalizovati; odnosno, samo se delimično odvijaju istim mehanizmima u različitim biljkama. Srodna jedinjenja samo do jedne određene faze nastaju ujednačenim biosintetskim putevima, a svaka pojedinačna biljna vrsta (ili tkivo) unosi specifičnosti u metaboličke procese (Kovačević, 2000). Ove specifičnosti se ogledaju u postojanju i/ili aktivnosti enzima u nekom određenom tkivu, ili u različitom supstratu, što doprinosi promenama osnovnog biosintetskog puta ili njegovom račvanju, a rezultira sintezom različitih sekundarnih metabolita (Kovačević, 2000). Primarni i sekundarni metabolizam su međusobno povezani, a granica između primarnog i sekundarnog metabolizma se često ne može jasno postaviti (Fridman i Pichersky, 2005; Böttcher i sar., 2008). Iako se dugo smatralo da sekundarni metaboliti nemaju veliki značaj za biljke, danas je poznato da sekundarni metaboliti predstavljaju sastavne delove nekih enzimskih sistema, imaju zaštitnu ulogu u biljkama koje su izložene stresu i patogenima, učestvuju u uspostavljanju ekološke međuzavisnosti između biljaka, životinja i mikroorganizama, imaju hormonsku aktivnost (Chappell, 2002; Keeling i Bohlmann, 2006; Taizz i Zeiger, 2010). Različiti sekundarni metaboliti biljaka imaju i veoma važnu primenu u farmaceutskoj industriji, industriji hrane (kao dodaci ishrani, začini i arome), u agrohemijskoj industriji, industriji boja i biopesticida. Preko 80% od oko 30.000 poznatih prirodnih produkata je biljnog porekla (Phillipson,

1990; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002). U zapadnim zemljama, gde je hemija osnova farmaceutske industrije, 25% molekula koji se koriste poreklom su od biljaka iz prirode (Payne i sar., 1991; Bourgaud i sar., 2001). Iako je tokom poslednjih osamdeset godina dobar deo ovih jedinjenja zamenjen sintetskim jedinjenjima, biljno carstvo je ostalo značajan izvor mnogih komponenata, koje je suviše teško i/ili neekonomično dobiti na neki drugi način.

Sekundarni metaboliti biljaka se mogu podeliti na tri hemijski različite grupe: terpene (oko 25.000), fenolna jedinjenja (oko 8.000) i alkaloida (jedinjenja koja sadrže azot- ~ 12.000) (Zwenger i Basu, 2008; Taiz i Zeiger, 2010).

1.1.1. Terpeni

Terpeni (sin. terpenoidi, izoprenoidi) predstavljaju najbrojniju grupu sekundarnih metabolita biljaka (Kovačević, 2000; Zwenger i Basu, 2008). Nastaju izoprenskim biosintetskim putem (Ruzicka, 1953) od aktivnih C5-jedinica, tj. od aktivnog izoprena, izopentenil difosfata (izopentil pirofosfat - IPP) i njegovog izomera dimetilalil difosfata (dimetilalil pirofosfat - DMAPP), zbog čega se često nazivaju i izoprenoidi (Taiz i Zeiger, 2010). Na osnovu broja ugljenikovih atoma, odnosno broja izoprenskih jedinica od kojih su izgrađeni, terpeni se mogu podeliti na monoterpene (10 C atoma, dve izoprenske jedinice), seskviterpene (15 C atoma, tri izoprenske jedinice), diterpene (20 C atoma, četiri izoprenske jedinice), triterpene (30 C atoma, šest izoprenskih jedinica), tetraterpene (40 C atoma, osam izoprenskih jedinica) i politerpene (>40C atoma, >8 izoprenskih jedinica; Taiz i Zeiger, 2010). Naknadnim reakcijama ciklizacije, uvođenjem različitih funkcionalnih grupa i reorganizacijom molekula, dolazi do stvaranja ogromnog broja različitih jedinjenja u okviru svake navedene klase. Pojedini autori ovako modifikovane terpene nazivaju terpenoidima, dok drugi autori pod terminom terpeni obuhvataju sve terpenoide i smatraju ih sinonimima (Zwenger i Basu, 2008; Taiz i Zeiger, 2010).

Strukturna raznovrsnost monoterpena je rezultat različitog načina povezivanja osnovnih gradivnih jedinica, intramolekulskog premeštanja i sekundarne ciklizacije. Monoterpeni mogu biti isparljivi sastojci etarskih ulja (pineni), kao i neisparljivi (iridoidi i sekoiridoidi). Prema najjednostavnijem sistemu klasifikacije monoterpeni se mogu podeliti na aciklične i ciklične, a po veličini prstena mogu biti monociklični,

biciklični i triciklični (Taiz i Zeiger, 2010). Monoterpeni se upotrebljavaju u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, u industriji hrane i začina (Mahmoud i Croteau, 2002). U prirodi ova jedinjenja predstavljaju deo integralnog odbrambenog mehanizma biljke od patogena, imaju ulogu u privlačenju oprašivača, a učestvuju i u međusobnoj komunikaciji između biljaka (Croteau i sar., 2000; Marin, 2003).

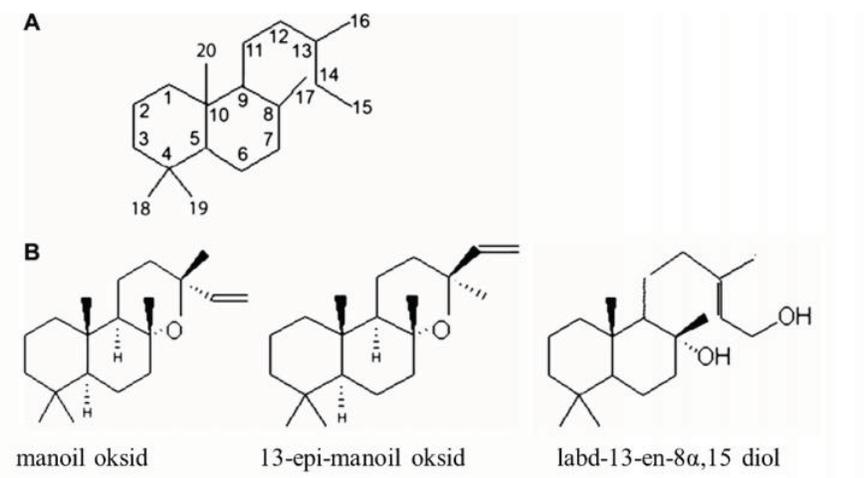
Seskviterpeni predstavljaju veoma raznoliku grupu jedinjenja koja imaju ulogu u sprečavanju napada herbivornih insekta, toksični su za razne biljne patogene i predstavljaju značajne alelopatske agense u interakcijama biljka-biljka (Keeling i Bohlmann, 2012). Po strukturi mogu biti aciklični, monociklični i biciklični (Graßmann, 2005; Aharoni i sar., 2005; Keeling i Bohlmann, 2012). Isparljivi seskviterpeni ulaze u sastav etarskih ulja, dok neisparljivi seskviterpeni (seskviterpenski γ -laktoni) imaju izrazito značajnu farmakološku aktivnost (Taiz i Zeiger, 2010; Keeling i Bohlmann, 2012).

Triterpeni se sastoje iz dve farnezanske jedinice povezane po principu glava-rep i nisu uobičajeni sastojci etarskih ulja. Javljaju se kao slobodna lipofilna jedinjenja (ugljovodonici, alkoholi, kiseline), heterozidi, saponozidi i sastojci smola (Sawai i Saito, 2011; Keeling i Bohlmann, 2012).

Diterpeni (C₂₀) pripadaju širokoj grupi jedinjenja koja nastaje iz 2E,6E,10E-geranil-geranil-difosfata (geranilgeranil pirofosfat - GGPP). Diterpeni u biljkama imaju važne ekološke i fiziološke funkcije i smatra se da među svim familijama prirodnih produkata diterpeni imaju najširi opseg bioloških aktivnosti (Chinou, 2005). Tako je diterpen fitol strukturni segment molekula hlorofila, giberelini predstavljaju hormone biljaka, dok fitoaleksini učestvuju u odbrani i zaštiti biljaka od patogenih mikroorganizama (Dewick, 2002). Osim uloge u regulatornim procesima, ova grupa jedinjenja je interesantna i sa stanovišta hemotaksonomije (Harborne i Turner, 1984). Iako mogu biti i aciklični (npr. fitol), diterpeni su najčešće ciklični, pri čemu se razlikuju biciklični, triciklični i tetraciklični diterpeni.

1.1.1.1. Labdanski diterpeni

Labdanski diterpeni (LD) predstavljaju veliku i raznovrsnu grupu pri čemu je preko 500 jedinjenja ovog tipa poreklom iz prirode, uglavnom iz viših biljaka. U osnovi strukture diterpena labdanskog tipa je dekalinski sistem i C-6 prsten, koji može biti otvoren ili zatvoren sa atomom kiseonika, kao kod manoil oksida i njegovih derivata (Chinou, 2005; Demetzos i Dimas, 2001; **Slika 1**). Labdanski diterpeni imaju 5 hirlnih C atoma i mogu se javljati u prirodi u dve enantiomerne serije. Uočeno je da se u jednoj biljnoj vrsti mogu javiti oba enetiomerna labdana (Zdero i sar., 1990; 1991). LD su detektovani kao sekundarni metaboliti u tkivima gljiva, insekata, morskih organizama, kao i u etarskim uljima, smoli i tkivima viših biljaka (John i sar., 1999; Toki i sar., 1999; Demetzos i Dimas, 2001; Chinou, 2005). Labdani su izolovani iz nekoliko biljnih familija poput *Asteraceae*, *Labiatae*, *Cistaceae*, *Pinaceae*, *Cupressaceae*, *Taxodiaceae*, *Acanthaceae*, *Annonaceae*, *Caprifoliaceae*, *Solenaceae*, *Apocynaceae*, *Verbenaceae* i *Zingiberaceae*. Među njima glavni izvori LD su golosemenice, kao i familije *Asteraceae*, *Lamiaceae* i *Zingiberaceae* (Chinou, 2005). Uzimajući u obzir da se labdani nalaze u svim četinarima mogu se koristiti kao hemotaksonomski markeri (Otto i Wilde, 2001), ali i kao značajni molekularni markeri u sistematici i filogeniji četinarara (Otto i sar., 2003).

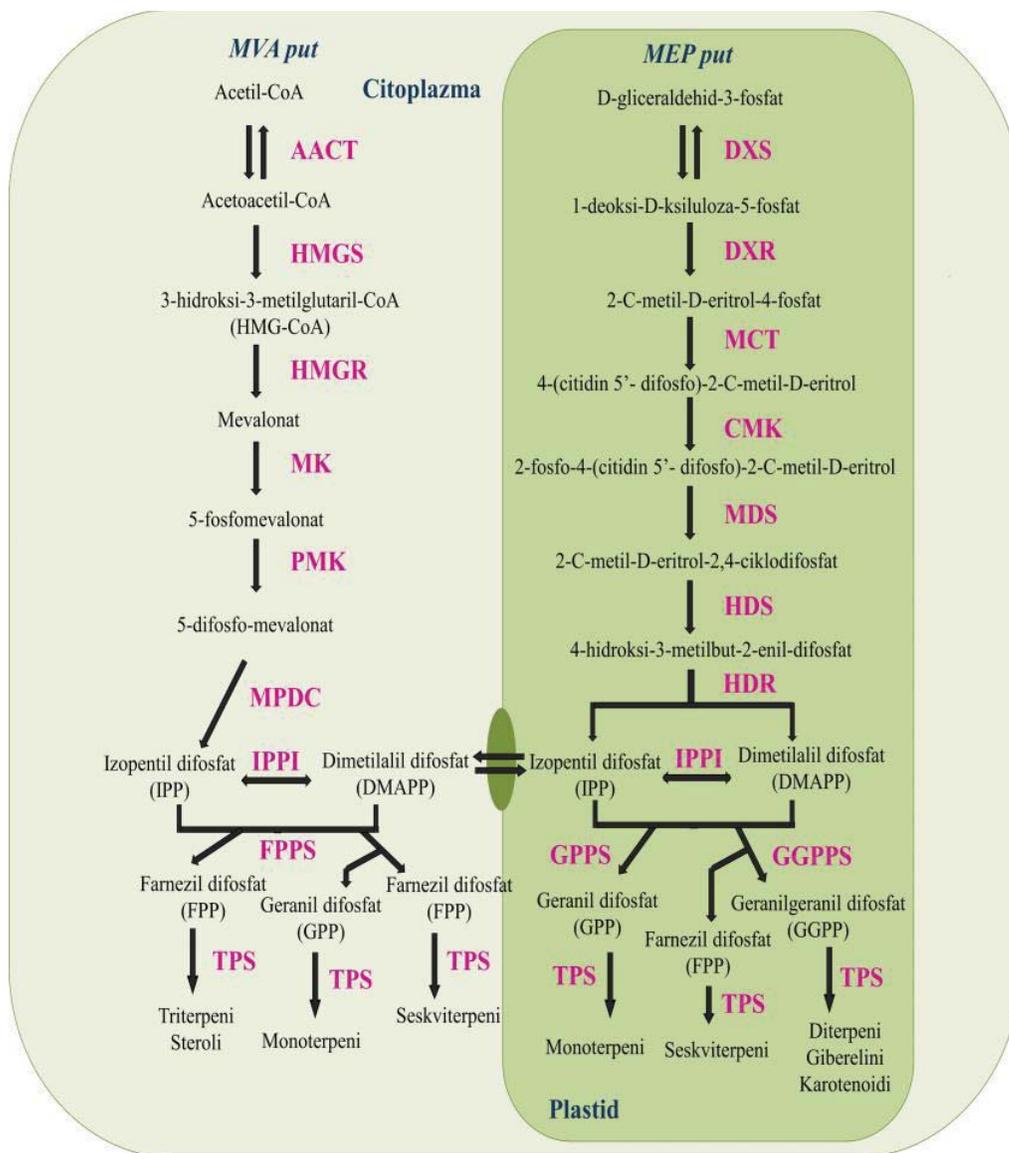


Slika 1. A) Osnovna hemijska struktura labdanskih diterpena B) Struktura maniol oksida, 13-epi-manoil oksida, labd-13-en-8 α ,15 diola (Falara i sar., 2010)

1.1.2. Biosinteza terpena

Svi terpeni nastaju kombinacijom iz dva univerzalna prekursora IPP i njegovog izomera DMAPP, koji su poreklom iz dva alternativna biosintetička puta: citosolnog mevalonatnog (MVA) puta i plastidnog metileritritol fosfatnog puta (MEP, **Slika 2**). Iako subcelularna lokalizacija omogućava da ova dva biosintetska puta funkcionišu nezavisno, metabolička komunikacija između njih ipak postoji (Schuhr i sar., 2003), posebno iz smera plastida ka citosolu (Hemmerlin i sar., 2003; Laule i sar., 2003). MVA biosintetski put se sastoji iz šest enzimatskih koraka koji dovode do formiranja IPP i obezbeđuje prekursore za biosintezu seskviterpena, sterola i ubihinona u biljkama (Newman i Chappell, 1999; Disch i sar., 1998; Gutensohn i sar., 2013). MEP biosintetski put uključuje sedam enzima koji kontrolišu formiranje IPP i DMAPP iz piruvata i D-gliceraldehid 3-fosfata. Ovim putem se stvaraju prekursori za nastanak monoterpena, diterpena, karotenoida, tokoferola i prenilnih jedinica hlorofila (Gutensohn i sar., 2013). Lokalizacija ovih enzima u plastidima je eksperimentalno dokumentovana od strane više autora (Querol i sar., 2002; Hsieh i sar., 2008). Iz molekula IPP i DMAPP, poreklom iz MEP ili MVA biosintetskog puta, nastaju geranil difosfat (GPP), farnezil difosfat (FPP) i geranilgeranil difosfat (GGPP) delovanjem enzima geranil difosfat sintaze (GPPS), farnezil difosfat sintaze (FPPS) i geranilgeranil difosfat sintaze (GGPPS). Ovi intermedijeri predstavljaju ključne tačke grananja izoprenoidnog metabolizma, odakle delovanjem različitih terpenskih sintaza (TPS), nastaju monoterpeni, diterpeni, seskviterpeni itd. (Vranová i sar., 2013; Gutensohn i sar., 2013).

Regulacija ekspresije gena MVA i MEP biosintetskog puta u biljkama se odigrava prvenstveno na transkripcionom nivou, mada se posttranslaciona regulacija ne može isključiti (Korth i sar., 2000; Guevara-Garcia i sar., 2005; Tholl i Lee, 2011; Vranová i sar., 2013). Transkripcioni nivo regulacije zavisi kako od stadijuma razvića, tako i od faktora spoljašnje sredine, a transkripcija gena unutar MEV i MVA puta nije tesno koordinisana, kao što bi se očekivalo za sintezu intermedijera u okviru istog puta (Vranová i sar., 2013).



Slika 2. Biosintetski put terpena u višim biljkama: MVA (mevalonatni) biosintetski put ograničen na citoplazmu i MEP (metileritritol fosfatni) put ograničen na plastide. Skraćenice enzima: AACT (acetyl-CoA C-acetyl transferaza); HMGS (HMG-CoA sintaza); HMGR (HMG-CoA reduktaza); MK (mevalonat kinaza); PMK (fosfomevalonat kinaza); MPDC (difosfomevalonat dekarboksilaza); DXS (1-deoksi-D-ksiluloza 5-fosfat sintaza); DXR (1-deoksi-D-ksiluloza 5-fosfat reduktiozomeraza); MCT (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat citidililtransferaza); CMK (4-(citidin 5'- difosfo)-2-C-metil-D-eritritol kinaza); MDS (2-C-metil-D-eritrol-2,4-ciklodifosfat sintaza); HDS (4-hidroksi-3-metilbut-2-enil-difosfat sintaza); HDR (4-hidroksi-3-metilbut-2-enil-difosfat reduktaza); IPPI (izopentil difosfat izomeraza), FPPS (farnezil difosfat sintaza); GPPS (geranil difosfat sintaza); GGPPS (geranilgeranil difosfat sintaza), TPS (terpenske sintaze). Predstavljena shema je modifikovana prema Vranová i sar., (2013) i Gutensohn i sar., (2013).

U MVA biosintetskom putu HMGR predstavlja glavni ograničavajući korak (Tholl i Lee, 2011; Vranová i sar., 2013). U prilog ovome govori smanjenje nivoa sterola i triterpena u *hmg* mutantima Arabidospisa, kao i povećanje produkcije sterola u transgenim biljkama *A. thaliana* sa povećanom (eng. *overexpression*) ekspresijom *HMGR* gena (Manzano i sar., 2004). Pozitivna korelacija između ekspresije *HMGR* gena i aktivnosti enzima sa povećanom produkcijom fitoaleksina je uočena u mnogim biljkama (Tholl i Lee, 2011). Istraživanja su pokazala da u MEP biosintetskom putu DXS funkcioniše kao važan regulatorna tačka (Chahed i sar., 2000; Lois i sar., 2000; Vranová i sar., 2013), dok je uloga DXR u smislu ograničavajućeg koraka u ovom biosintetskom putu nešto manje jasna (Tholl i Lee, 2011).

1.1.2.1. Biosinteza labdanskih diterpena

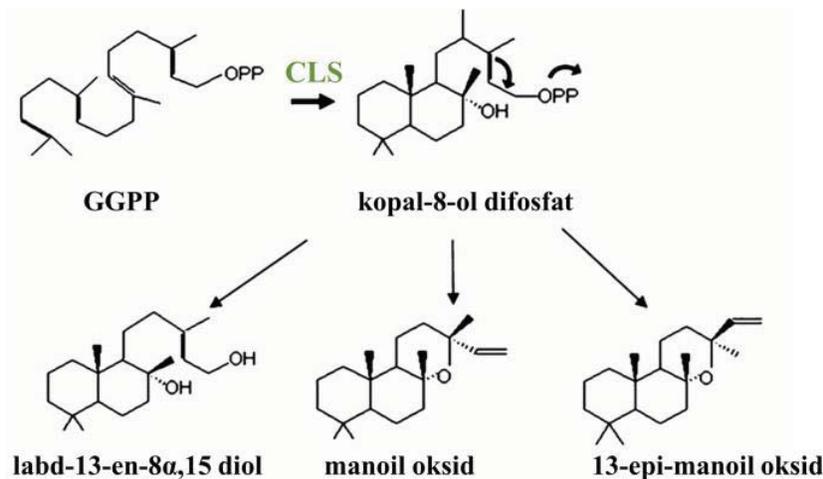
Svi diterpeni nastaju kondenzacijom DMAPP i 3 molekula IPP (Koepp i sar., 1995; Liang i sar., 2002; Chinou, 2005) pri čemu nastaje aciklični molekul GGPP (C20). Geranilgeranil difosfat sintaza (GGPPS) je trans-preniltransferaza odgovorna za sintezu GGPP i prisutna je u biljkama, životinjama i bakterijama (Ogura i Koyama, 1998). GGPP zatim podleže brojnim ciklizacijama koje katalizuju diterpen sintaze (diTPS), a zatim slede razne modifikacije skeleta pri čemu nastaje nekoliko hiljada diterpena biljnog porekla (Bohlmann i sar., 1998; Trapp i Croteau, 2001a). U ovim modifikacijama skeleta važnu ulogu imaju citohrom P450 monooksigenaze (CYP450s) (Ro i sar., 2005; Wang i sar., 2011; Hamberger i Bak, 2013). U biosintezi labdanskih diterpena inicijalna ciklizacija GGPP dovodi do formiranja stereoizomera kopalil difosfata (CPP) pri čemu ovu inicijalnu ciklizaciju katalizuju diterpen sintaze tipa II (diTPSII) (Peters, 2010), koje se nazivaju i kopalil difosfat sintaze (CPS). U prirodi postoje 4 različita stereoizomera CPP: *normal*, *ent*, *syn* i *syn-ent* (Peters, 2010; Chen i sar., 2011). Najučestaliji je *ent*-CPP, koji produkuju sve više biljke budući da je nephodan prekursor u biosintezi giberelina (Peters, 2010). Četinari produkuju samo *ent* i *normal* CPP, pirinač produkuje i *syn*-CPP. *Syn-ent*-CPP sterohemiju dokazano poseduju samo jedinjenja iz biljaka roda *Calceolaria* (Garbarino i sar., 2001). Naknadnom reakcijom ciklizacije koju katalizuju diterpen sintaze tipa I (diTPSI), formira se labdanski olefin. Pirinač poseduje 8 članova familije sintaza tipa I koji produkuju širok

spektar diterpena poput momilaktona, orizoleksina i fitokazana (Nemoto i sar., 2004; Kanno i sar., 2006).

Istraživanja biosinteze labdanskih diterpena su uglavnom bila fokusirana na metabolički put koji vodi do *ent*-kaurena, prekursora giberelina, i sličnih labdanskih ditrepena koji ne sadrže kiseonik u svom skeletu (Falara i sar., 2010). Otkriveno je da postoje dva različita enzima kod golosemenica i skrivenosemenica koji dovode do formiranja *ent*-kaurena: CPS (diTPSII) koji dovodi do formiranja *ent*-CPP i kauren sintaza (diTPSI) koja dovodi do formiranja *ent*-kaurena iz *ent*-CPP (Sakamoto i sar., 2004; Keeling i sar., 2010). Kod golosemenica diterpene labdanskog tipa bez kiseonika u svom skeletu pored monfunkcionalnih diterpen sintaza (tipa I i II) produkuju i bifunkcionalne tip II/I sintaza, kao npr abietadien sintaza iz *Abies grandis* (Stofer Vogel i sar., 1996) ili levopimardien sintaza iz *Ginco biloba* (Schepmann i sar., 2001). Ovi bifunkcionalni enzimi kataliziraju obe reakcije: prvo ciklizaciju GGPP u CPP, a zatim konverziju CPP u finalne skelete koji mogu kasnije podleći oksidaciji (Ro i sar., 2005; Hamberger i Bohlmann, 2006).

Biosinteza labdanskih diterpena sa kiseonikom u svom skeletu je bila nedovoljno razjašnjena (Falara i sar., 2010). Guo i saradnici (1994) i Guo i Wagner (1995) su prvi postavili hipotezu da je kopal-8-difosfat inetrmedijer u biosintezi diterpena abienola, labdendiola i sklareola u trihomama *Nicotiana glutinosa* i *Nicotina tabacum*. Međutim, do skoro nije bio poznat enzim koji bi mogao da katalizuje nastanak ovog intermedijera. Falara i saradnici su 2010. godine pokazali da kopal-8-ol difosfat sintaza (CLS), diterpen sintaza klase II, dovodi do formiranja kopal-8-ol difosfata iz GGPP. Uloga diterpen sintaza klase II u ovom procesu nedavno je potvrđena i od strane Sallaud i sar. (2012) i Pateraki i sar. (2014).

Po predloženom modelu Falara i saradnika (2010) druga ciklizacija kopal-8-ol difosfata dovodi do formiranja izomera manoil oksida ili labd-13-en-8 α ,15-diola pomoću ditrepen sintaza tipa I (**Slika 3**). Nedavno je ovaj hipotetički model i eksperimentalno potvrđen, pošto su Pateraki i saradnici (2014) izolovali i potvrdili ulogu diterpen sintaza klase I u biosintezi manoil oksida iz kopal-8-ol difosfata u biljkama *Coleus forskohlii*.



Slika 3. Pretpostavljeni model sinteze diterpena labdanskog tipa u biljnoj vrsti *C. creticus*. Enzim kopal-8-ol difosfat sintaza (**CLS**) konvertuje GGPP u stabilan intermedijer kopal-8-ol difosfat. Sledeća ciklizacija kopal-8-ol difosfata dovodi do formiranja karakterističnih labdanskih diterpena poput izomera manoil oksida i labd-13-en-8 α -15 diola. Pretpostavlja se da je su u ove procese uključeni enzimi diterpen sintaze tipa I (Falara i sar., 2010)

1.1.3. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja u svom sastavu imaju jedan ili više aromatičnih prstenova sa jednom ili više hidroksilnih grupa (Dai i Mumper, 2010). Široko su rasprostranjeni u biljkama i mogu biti jednostavni molekuli kao što su fenolne kiseline, ali i visoko polimerizovane supstance kao npr. tanini (Crozier i sar., 2006). Postoje različite klasifikacije fenola. Na osnovu broja konstitutivnih ugljenikovih atoma osnovnog skeleta, fenolna jedinjenja se mogu svrstati u nekoliko grupa i obično su konjugovana sa šećerima i organskim kiselinama (Crozier i sar., 2006).

Fenoli se generalno dele na dve grupe: flavonoide i neflavonoide (Crozier i sar., 2006). Flavonoidi sadrže fenilbenzopironsku strukturu (15 C atoma aranžiranih u dva aromatična prstena povezana sa mostom od 3 C atoma (C6-C3-C6; Ren i sar., 2003; Crozier i sar., 2006; Dai i Mumper 2010) i mogu se, na osnovu oksidacionog stanja centralnog C prstena, podeliti na 6 grupa: flavone, flavonole, flavanole, flavanone, izoflavone i antocijanine (Ren i sar., 2003; Dai i Mumper, 2010). Najpoznatiji flavonoidi su kvercetin, katehin, daidzein itd. Najznačajnija neflavonoidna jedinjenja

su fenolne kiseline (C6-C1 i C6-C3) i polifenolni stilbeni (C6-C2-C6; Crozier i sar., 2006; Martins i sar., 2011). Fenolne kiseline sadrže najmanje jednu karboksilnu i jednu fenolnu hidroksilnu grupu. Fenolkarbonske kiseline obuhvataju dve vrste metabolita: derivate benzojeve kiseline (C6-C1, npr. galna, vanilinska, elaginska kiselina) i derivate cimetine kiseline (C6-C3, kumarinska, kafeinska, ferulinska kiselina; Robbins, 2003; Crozier i sar., 2006; Boros i sar., 2010).

Fenolna jedinjenja su klasa sekundarnih metabolita sa velikim ekološkim značajem (Croteau i sar., 2000). Naime, oko 40% organskog ugljenika cirkuliše u biosferi, a većina ovog fotoasimilovanog ugljenika je u formi lignina, suberina i sličnih strukturnih polimera koji imaju ulogu u mehaničkoj potpori i vaskularnom transportu biljnih tkiva (Smirnoff, 2005). Pojedina fenolna jedinjenja poput salicilne kiseline imaju signalnu ulogu, a smatra se da imaju ulogu i u različitim esencijalnim fiziološkim funkcijama koje su povezane sa stresnim uslovima. Tako fenolna jedinjenja učestvuju u zaštiti od UV zračenja, odbrani od herbivora i patogena, i generalno zaštiti od oksidativnog stresa (Smirnoff, 2005). Osim uticaja na interakcije između biljaka i životinja, postoje podaci da fenolna jedinjenja posreduju i u interakcijama između biljaka i mikroorganizama (Shirley, 1996), kao i između biljaka međusobno (Bais i sar., 2003).

1.1.4. Biosinteza fenolnih jedinjenja

Najvažniji put biosinteze fenolnih jedinjenja kod viših biljaka je ciklus šikimske kiseline (Taizz i Zeiger, 2010, Maeda i Dudareva, 2012). Kondenzacijom eritroza-4-fosfata i fosfoenolpiruvata (PEP), preko niza međuproizvoda, nastaje šikimat, ključni intermedijer po kome je ovaj biosintetski put i dobio ime. Iz šikimata, preko horizmata nastaju aromatične amino kiseline fenilalanin, tirozin i triptofan, čijim se daljim transformacijama dobijaju različite klase sekundarnih metabolita. Tako se fenilalanin prevodi u cimetnu kiselinu, odnosno p- hidroksicimetnu kiselinu, koja je ključni intermedijer u biosintezi fenilpropanskih struktura, fenilpropena, kumarina, lignana i lignina. S druge strane, u reakciji p-hidroksicimetine kiseline sa tri malonatne jedinice nastaju flavonoidi, odnosno izoflavonoidi, ksantoni, stilbeni, proantocijanidini, tanini. Od triptofana nastaju auksini, indolni fitoaleksini i glukozinolati (Nešković i sar., 2003; Maeda i Dudareva, 2012).

1.2. Produkcija sekundarnih metabolita u kontrolisanim uslovima

Često se visoko vredni sekundarni metaboliti u prirodi nalaze u maloj količini (Oksman-Caldentey i Inzé, 2004; Chandra i Chandra, 2011). Usled kompleksne strukture izolacija ovakvih biljnih jedinjenja iz njihovih prirodnih izvora tj. biljaka često predstavlja jedinu mogućnost, uprkos naporima farmaceutske industrije da se razvije delimična ili potpuna hemijska sinteza. Čak i u slučajevima kada je sinteza razvijena, ona je više od naučnog značaja nego od ekonomske i proizvodne važnosti (Karuppusamy, 2009). Proizvodnja sekundarnih metabolita se dugo postizala poutem plantažnog gajenja odgovarajućih vrsta lekovitih biljaka. Međutim, neke biljne vrste koje rastu na specifičnom životnom staništu teško mogu da se gaje van lokalnog ekosistema (Gómez-Galera i sar., 2007). Plantažno gajenje je često otežano i usled osetljivosti na patogene (npr. antraknoza na *Hypericum perforatum* ili *Arnica montana*; Bougaud i sar., 2001). Iako kultivacija lekovitog bilja ima konzervacione prednosti, troškovi mogu biti previsoki usled sporog rasta ili činjenice da se mnoge tropske biljke teško mogu gajiti u komercijalnim uslovima (Gómez-Galera i sar., 2007).

U prošlosti, potrebne količine biljnog materijala su bile male, ali je porast komercijalnih potreba brzo nadmašio ponudu. U budućnosti se očekuje porast upotrebe lekovitog bilja kako u alternativnoj, tako i u tradicionalnoj medicini. Ovakav rastući trend se predviđa ne samo zbog porasta brojnosti ljudske populacije, već i zbog povećane popularnosti prirodno baziranih ekoloških proizvoda, što predstavlja pritisak na prirodne izvore i stoga potreba za ozbiljnim konzervacionim naporima uključujući i kultivacione tehnike nikad nije bila veća. Godišnje se trguje sa oko 400.000 tona lekovitog bilja, a preko 70% biljnih vrsta koje se koriste u medicini, kozmetici i drugim industrijama se sakupljaju iz prirode (Leaman, 2008). Usled ogromne degradacije staništa u mnogim regionima, danas je četvrtina ovih vrsta ugroženo. Po Evropskoj Biljnoj Konzervacionoj Strategiji (eng. *The European Plant Conservation Strategy - EPCS*) 90% lekovitih i aromatičnih biljaka koje su poreklom iz Evrope se još uvek sakupljaju iz prirode. Oko četvrtini biljnih vrsta koje se koriste za lečenje, kozmetiku ili kao dodaci ishrani preči izumiranje (Marshall, 2011). Stoga su biotehnoški pristupi, poput *in vitro* kulture biljaka, od vitalnog značaja u istraživanju alternativa za

proizvodnju željenih lekovitih jedinjenja iz biljaka (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002).

1.2.1. *In vitro* kultura biljaka

Kapacitet biljnih ćelija, tkiva i organa da produkuju i akumuliraju identična hemijska jedinjenja kao i biljke iz prirode uočen je još na samom početku razvića *in vitro* tehnologije (Verpoorte i sar., 2002; Karuppusamy, 2009). Snažan i rastući zahtev tržišta današnjice za prirodnim, obnovljivim proizvodima je preusmerio pažnju na *in vitro* biljni materijal kao potencijalnu „fabriku“ sekundarnih metabolita i obezbedio put za nova istraživanja koja proučavaju produkciju sekundarnih metabolita *in vitro* (Neumann i sar., 2009, Karuppusamy, 2009). Smatra se da *in vitro* kultura može dovesti do profitabilne proizvodnje nekih od ovih jedinjenja, pri čemu uspeh proizvodnje zavisi ili od visoke produktivnosti (npr. šikonin iz *Lithospermum erythrorhizon*), ili od visoke vrednosti na tržištu (npr. paklitaksel iz *Taxus* spp.) (Weathers i sar., 2010). Međutim, nije samo komercijalni značaj taj koji dovodi do inicijative u istraživanjima *in vitro* kultura biljaka. Stimulacija produkcije određenih jedinjenja pod strogo kontrolisanim uslovima u kulturi *in vitro* predstavlja odličan model sistem za detaljnije istraživanje biohemijskih i metaboličkih puteva (Bourgaud i sar., 2001; Verpoorte i sar., 2002; Karuppusamy, 2009, Gaosheng i Jingming, 2012).

Važno je istaći da postoji nekoliko različitih prednosti proizvodnje sekundarnih metabolita u uslovima *in vitro*. Na ovaj način sekundarni metaboliti se mogu proizvoditi tokom cele godine bez sezonskih ograničenja. Ova tehnika eliminiše potencijalne političke granice i geografske barijere u proizvodnji, kao što su npr. ograničenje prirodne proizvodnje gume u tropima ili proizvodnja antocijanina u klimatskim područjima sa visokim svetlosnim intenzitetom (Karuppusamy, 2009). Prilikom *in vitro* gajenja biljka ne postoje variranja u klimatskim uslovima, ne koriste se insekticidi i herbicidi, a sekundarni metabolizam se može regulisati u cilju maksimalne proizvodnje željenog jedinjenja. Proizvodnja može biti pouzdanija, jednostavnija i predvidljivija, izolacija sekundarnih metabolita može biti brža i efikasnija, a prinos po gramu sveže mase može prevazići prinos iz prirode. Veoma važna prednost *in vitro* kultura je i

mogućnost njene upotrebe kao modela za testiranje elicitacije različitim abiotičkim i biotičkim faktorima.

Postoje tri glavna tipa *in vitro* biljnog materijala koji se mogu koristiti za proizvodnju jedinjenja od značaja: ćelijska suspenzija, kultura transgenih korenova (eng. *hairy roots*) i kultura izdanaka (Weathers i sar., 2010). Iako postoji uspešna proizvodnja sekundarnih metabolita u suspenziji ćelija, genetička nestabilnost kultura koja tokom vremena može da nastane, slab prinos biomase, spor rast itd. uticali su da se suspenzija ćelija sve ređe koristi (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Weathers i sar., 2010). Tokom poslednjih nekoliko godina diferencirane kulture izdanaka privlače sve veću pažnju istraživača. Danas se *in vitro* kultura izdanaka ne uspostavlja samo kao efektivna tehnika za mikropropagaciju ili produkciju biomase *in vitro* biljaka, već i kao moćna tehnika za produkciju značajnih bioaktivnih jedinjenja (Steingroewer i sar., 2013). Ove *in vitro* kulture su veoma atraktivni sistemi, pogotovo za produkciju veoma kompleksnih i skupih jedinjenja poput hipericina (Coste i sar., 2011), vindolina (Vázquez-Flota i sar., 2009), galantamina (Georgiev i sar., 2012) ili kao biološki modeli za ekspresiju rekombinantnih proteina (Michoux i sar., 2011). Za popuno iskorišćenje potencijala kulture izdanaka kao proizvođača bioaktivnih jedinjenja, neophodno je optimizovati uslove i tehnike gajenja (Steingroewer i sar., 2013). U tom cilju vrši se pregled i selekcija odabranih genotipova, optimizacija medijuma na kojem se biljke gaje, uspostavljaju se kulture diferenciranih organa, ispituje se regulacija produkcije sekundarnih metabolita analizom enzima odgovornih za biosintezu odabranih jedinjenja, utvrđuje se uticaj abiotičkih i biotičkih faktora na produkciju sekundarnih metabolita, vrši se genetička transformacija biljka, itd.

1.2.2. Regulatorna uloga ugljenih hidrata

Biljke koje rastu *in vitro* su delimično autotrofne (Hazarika, 2003) i imaju ograničenu dostupnost ugljen dioksida unutar posuda za gajenje kultura (Vinterhalter i Vinterhalter 1996; Hazrika, 2003). Dodavanjem saharoze u medijum zadovoljavaju se energetske potrebe neophodne za rast i fiziološke funkcije biljke (Hazarika, 2003). Saharoza obezbeđuje prekursore ugljenika neophodne za strukturne i funkcionalne komponente (Marino i sar., 1993; Jo i sar., 2009). Glukoza i fruktoza u kulturi *in vitro* takođe mogu služiti kao izvori ugljenika i energije. U nekim slučajevima su se glukoza

(Yu i Reed, 1993; Mišić i sar., 2005b), ređe fruktoza (Welander i sar., 1989) pokazale efikasnijim od saharoze. Dodavanje šećera u medijum doprinosi i održanju osmotskog potencijala ćelije i očuvanju vode (Hazarika, 2003), a može da favorizuje i *ex vitro* aklimatizaciju i ubrza fiziološku adaptaciju (Pospíšilová i sar., 1999). Međutim, ugljeni hidrati (UH) pri višim koncentracijama mogu imati i negativan uticaj na rast (Kwa i sar., 1995; Jo i sar., 2009), fotosintezu (Hdider i Desjardins, 1994) i ekspresiju enzima uključenih u put asimilacije ugljenika (Kilb i sar., 1996; Hanson i Smeekens, 2009).

Ugljeni hidrati pored nutritivne poseduju i signalnu ulogu pomoću koje mogu da utiču na ekspresiju gena i na razvojne procese kod biljaka (Rolland i sar., 2006; Smeekens i sar, 2010). Geni na čiju ekspresiju utiču šećeri obično su direktno ili indirektno uključeni u kontrolu metabolizma i distribucije ugljenih hidrata, ali i u odbrambene mehanizme biljaka, kao i u puteve biosinteze sekundarnih metabolita i rezervnih proteina, u procese fotosinteze i asimilacije azota (Koch, 1996; Rolland i sar., 2006). Šećeri regulišu ekspresiju gena na različitim nivoima: transkripcionom, posttranskripcionom (utiču na stabilnost i procesiranje transkripta), translacionom, posttranslacionom (utiču na stabilnost, funkcionalnost i aktivnost proteina; Rolland i sar., 2006; Smeekens i sar, 2010). Povezanost između procesa fotosinteze i akumulacije metabolita su strogo koordinisani, pri čemu ova koordinacija uključuje kako metaboličku (supstratnu i alosteričnu) regulaciju, tako i specifične signalne mehanizme (Rolland i sar., 2006). Iako je saharoza glavni fotosintetski produkt i transportni šećer u biljkama, mnogi efekti ugljenih hidrata rastenje i metabolizam mogu se pripisati delovanju njenih heksoznih produkata tj. glukozi i fruktozi (ili njihovim nizvodnim metaboličkim intermedijerima; Rolland i sar., 2006). Međutim, postoje podaci da i saharoza i trehaloza (ili T6P, trehalozo-6- fosfat) regulišu specifične odgovore na koje ne utiču heksoze (Rolland i sar., 2006). Šećeri kao signalni molekuli imaju efekta u svim fazama životnog ciklusa biljaka počev od klijanja semena i vegetativnog rasta, preko reproduktivnog razvoja i obrazovanja semena, sve do senescencije (Todorović i sar., 2006; Gupta i Kaur, 2005; Yaseen i sar., 2013). Percepcija i signalni putevi UH su visoko kompleksni procesi koji dovode do mnogih promena u fiziologiji i razviću i integrisani su sa drugim signalnim putevima u biljkama kao što su oni vezani za neorganske nutritivente, hormone i različite stresne faktore (Rolland i sar., 2006; Smeekens i sar, 2010). Poslednjih godina značajan progres je napravljen u identifikaciji

kontrolnih regulatornih sistema rastenja biljaka koji primaju informacije od šećera i derivata njihovog metabolizma (Smeekens i sar., 2010). Među njima je i protein kinaza srodna SNF-1 (SnRK1 eng. *SNF1-related Protein Kinase 1*). SnRK za koju se smatra da je uključena u odgovor na nedostatak šećera kao i u regulaciju metabolizma, je aktivirana saharozom (Halford i sar., 2003). Istovremeno SnRK inaktivira nekoliko enzima kao što je HMGR i saharozno fosfatna sintaza putem fosforilacije (Sugden i sar., 1999). Regulacija HMGR je posebno značajna budući da je ovo jedan od ranih ključnih enzima u MVA biosinteskom putu terpena (Chappell i sar., 1995). Saharozna utiče i na akumulaciju transkripata nekoliko gena MEP puta u biljkama gajenim u mraku poput *DXR* i *DXS* (Hsieh i Goodman, 2005). Uticaj na povećanje ekspresije ova dva gena, kao i još četiri gena uključenih u biosintezu seskviterpena artemizina zabeleženo je i u klijancima *Artemisia annua* koji su gajeni na 3% glukozi, dok u klijancima gajenim na fruktozi nije dolazilo do ovakvih promena (Arsenault i sar., 2010). Generalno utičući na ekspresiju gena i enzimatske aktivnosti, šećeri utiču i na produkciju sekundarnih metabolita, pa tako i terpena (Wang i Weathers, 2007; Arsenault i sar., 2010). Kod već pomenutog efekta glukoze na ekspresiju gena u MEP putu zabeleženo je povećanje količine seskviterpena artemizina u klijancima *Artemisia annua* gajenim na medijumu sa dodatkom ove heksoze (Wang i Weathers, 2007). Sa povećanjem glukoze u medijumu rasla je i količina monoterpena nepetalaktona u izdancima *Nepeta rtanjensis* (Mišić i sar., 2005b). Povećanje koncentracije kako glukoze, tako i saharoze i fruktoze u podlozi za gajenje dovelo je do povećanja količine neisparljivih monoterpena sekoiridoida u izdancima *Centaurium pulchellum* (Krstić i sar., 2003). Dodavanje saharoze u medijum indukovalo je povećanje produkcije i diterpena paklitaksela u kulturi ćelija *Taxus chinensis* (Kim i sar., 2001).

1.2.3. Genetička transformacija pomoću *Agrobacterium rhizogenes*

Pod genetičkom transformacijom biljaka podrazumeva se stabilna integracija stranih gena u biljni genom (Slater i sar., 2004; Simonović, 2011). Transfer gena se može ostvariti direktnim ili indirektnim putem (posredstvom bioloških vektora npr. bakterija iz roda *Agrobacterium*). Velika uloga u razvoju oblasti genetičkog inženjeringa biljaka pripisuje se otkrivanju mehanizma delovanja štapićastih gram–negativnih bakterija *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* (Binns i Campbell, 2001; Ono i Tian, 2011).

Na mestu infekcije biljke sa *A. rhizogenes* pojavljuju se adventivni korenovi. Ove korenove odlikuje veoma brz rast, razgranatost i odsustvo geotropizma (Nešković i sar., 2003; Veena i Taylor, 2007; Ono i Tian, 2011). *A. rhizogenes* sadrži Ri (eng. *root inducing*) plazmid, pri čemu se u biljnu ćeliju prenosi fragment DNK ovog plazmida koja se naziva T-DNK (eng. *transferred DNK*). Transfer T-DNK u biljnu ćeliju i integracija u genom biljke domaćina omogućava bakteriji da eksprimira svoje gene u biljnom organizmu (Nešković i sar., 2003). Tumorske ćelije sintetišu posebnu klasu jedinjenja - opine. Na osnovu opina koje proizvode sojevi *A. rhizogenes* se mogu podeliti na nekoliko osnovnih grupa: agropinski, manopinski, mikimopinski i kukumopinski (Veena i Taylor, 2007, Simonović, 2011). T-DNK Ri-plazmida agropinskih sojeva *A. rhizogenes* sadrži dva odvojena regiona, oba ograničena direktnim ponovcima. Desni segment (TR) obuhvata onkogene značajne za produkciju agropina, manopina i auksina, dok levi segment (TL) obuhvata *rol* gene (eng. *root locus gene: rolA, rolB, rolC i rolD*) značajne za proces indukcije korenova (Simonović, 2011). Uključivanjem transkripcije odbrambenih gena putem još neobjašnjelog mehanizma *rol* geni utiču na rastenje i razviće transformanata, kao i na produkciju sekundarnih metabolita (Meyer i sar., 2000; Bulgakov, 2008).

Transformacija date biljne vrste pomoću prirodnog vektor sistema *A. rhizogenes* predstavlja jedan od novijih pravaca istraživanja u cilju povećanja produkcije sekundarnih metabolita (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Karuppusamy, 2009; Steingroewer i sar., 2013; Mišić i sar., 2013). Naime, većina napora u istraživanjima koja umesto ćelijske suspenzije koriste diferencirane kulture se fokusirala na transformisane korenove. Ovi korenovi mogu da sintetišu značajne sekundarne metabolite obezbeđujući komercijalnu proizvodnju (Chandra i Chandra, 2011). Takođe, poznato je da neki geni koji učestvuju u određenim biosintetskim putevima nisu ekspimirani u korenovima nego u nadzemnim delovima biljke kao što su izdanci i listovi. Međutim, često i kulture transformisanih korenova mogu da akumuliraju ove metabolite (Weathers i sar., 1994; Giri i sar., 2000). S druge strane poznati su i slučajevi da transformisani korenovi mogu da produkuju sekundarne metabolite koji primarno nisu prisutni u majci biljci (Veerasham, 2004; Srivastava i Srivastava 2007). Činjenica da transformisani korenovi, za razliku od netransformisanih, intenzivno rastu, gube gravitropsku reakciju i granaju se produkujući veliku biomasu u kontrolisanim uslovima

na medijumu bez regulatora rastenja (Tepfer, 1983; Tepfer i Casse–Delbart, 1987; Bourgaud i sar., 2001; Momčilović i sar., 2001; Nikolić i sar., 2003/2004), predstavlja veliku prednost u tehnologiji produkcije sekundarnih metabolita. Pored značajnog kapaciteta rasta, glavna karakteristika transformisanih korenova je da mogu da proizvode sekundarne metabolite istovremeno sa brzim rastom (Bourgaud i sar., 2001). Stoga je moguće dobiti stalan izvor sekundarnih metabolita iz brzorastućih kultura transformisanih korenova.

Transformisani korenovi mogu često da regenerišu celu biljku i da zadrže svoju genetičku stabilnost tokom kontinualne subkultivacije i regeneracije. Takođe, predstavljaju izvrednu mogućnost za uvođenje dodatnih gena zajedno sa Ri plazmidom i kao takvi imaju veliki značaj u molekularnom oplemenjivanju (Giri i Narasu, 2000; Casanova i sar., 2005; Christensen i Müller, 2009) i metaboličkom inženjerstvu (Hu i Du, 2006; Mehrotra i sar., 2010), pored upotrebe u proučavanju fiziologije korena i molekularnih interakcija u rizosferi, fitoremedijaciji (Doran, 2009) i produkciji rekombinantnih proteina (Ono i Tian, 2011).

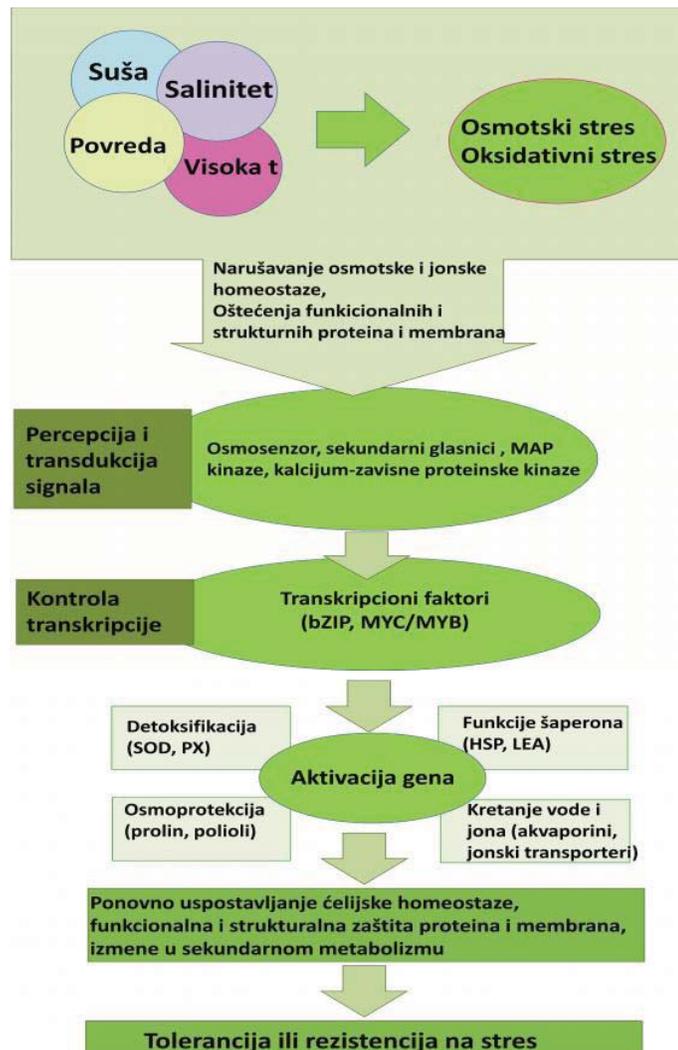
1.2.4. Abiotički stres – fiziološki značaj i uticaj na produkciju sekundarnih metabolita

Sam termin stres podrazumeva pritisak ili tenziju, koju biljci nameću nepovoljni spoljašnji uticaji (abiotički faktori), ili nepovoljni uticaji nekog drugog živog organizma (biotički faktori, Nešković i sar., 2003). Međutim, određeni uslovi sredine koji izazivaju stres kod jedne biljne vrste mogu da predstavljaju optimalne uslove za rastenje i razviće drugih vrsta (Slater i sar., 2008). Cassells i Curry (2001) su pod pojmom stresa definisali svako variranje biotičkih i abiotičkih faktora van optimalnog opsega vrednosti koje dovodi do oštećenja i oboljenja biljaka, kao i do brojnih nepovoljnih fizioloških promena. Nepovoljni svetlosni uslovi, ograničena količina i/ili dostupnost vode, temperaturni šokovi, smanjena količina ili otežano usvajanje hranljivih materija, mehanički stres, povećan salinitet u podlozi su samo neki od primera abiotičkog stresa.

Suštinu stresa zapravo predstavljaju promene osnovnog fiziološkog stanja biljaka, koje ugrožavaju normalno odvijanje životnih procesa (Gaspar i sar., 2002). Reakcija na stres započinje percepcijom signala što potom aktivira kaskadu intracelularnih signalnih

reakcija koje prenose informaciju o stresu kroz ćeliju. Ova transdukcija signala u biljkama izloženim stresu se može odvijati na tri načina: 1) osmotski/oksidativnim signalnim putem preko mitogenin aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK), 2) Ca^{2+} -zavisnim signalnim putem koji dovodi do aktivacije LEA (eng. *late embryogenesis abundant*)-sličnih gena (klase *DRE/CRT* gena –eng. *dehydration responsive elements/cold responsive sensitive transcription factors*), 3) Ca^{2+} -zavisnim SOS (eng. *salt overlay sensitive*) signalnim putem koji dovodi do jonske homeostaze (Kaur i Gupta, 2005). Nakon transdukcije signala indukuje se ekspresija određenih gena i sinteza stresogenih proteina, ćelija reaguje u okviru specifičnog metaboličkog odgovora i, zatim kao rezultat nastaje određena fiziološka reakcija. Dejstvo stresogenih faktora na biljke može biti primarno, ali i sekundarno, nastalo kao rezultat indukcije sekundarnih stresogenih faktora pod dejstvom primarnih faktora, kao što je naprimer oksidativni stres, koga mogu da indukuju mnogi primarni faktori poput suše, ekstremnih temperatura itd. (Vujičić i sar., 2014). Kompleksnost odgovora biljaka na abiotički stres, koji uključuje brojne gene i biohemijske-molekularne mehanizme je šematski prikazan na **Slici 4** (Wang i sar., 2003).

Mehanizmi koji omogućavaju biljci da preživi stres nazivaju se opštim imenom rezistencija ili otpornost (Vujičić i sar., 2014). Fiziološki odgovor biljaka na neki stresogeni faktor može biti ili izbegavanje stresa ili tolerancija na stres. Tolerancija na stres se može ispoljiti u formi adaptacije (obuhvata konstitutivne, preformirane, genotipski determinisane, morfološke i/ili fiziološke karakteristike vrste) i aklimatizacije (podrazumeva prilagođavanje jedinke na izmenjene uslove sredine; Vujičić i sar., 2014). Tokom ispitivanja gena povezanih sa adaptacijom na stres tehnike poput DNK čipova su bile neprocenjive u otkrivanju čitavih lista gena indukovanih stresom. Ovi geni se mogu svrstati u tri glavne grupe: 1) geni koji su uključeni u signalnu kaskadu i kontrolu transkripcije poput MAP kinaza, SOS kinaza, MyC (Zhu, 2001; Wang i sar., 2003); 2) geni koji direktno učestvuju u zaštiti membrana i proteina kao što su proteini toplotnog šoka tj. HSP proteini (eng. *heat shock protein*), šaperoni, LEA proteini, osmoprotektanti i „hvatači“ slobodnih radikala (Bray i sar., 2000; Wang i sar., 2003); 3) geni koji kontrolišu usvajanje i transport vode i jona poput akvaporina i jonskih transportera (Blumwald, 2000; Wang i sar., 2003).



Slika 4. Kompleksnost biljnog odgovora na abiotički stres. Primarni stresovi, poput suše, saliniteta, hladnoće, toplote i hemijskog zagađenja su često isprepletani i dovode do oštećenja ćelija i sekundarnih stresova poput osmotskog i oksidativnog stresa. Inicijalni stresni signali (npr. osmotski i jonski efekti, temperatura, promena fluidnosti membrane) pokreću nizvodne signalne procese i kontrolu transkripcije koji aktiviraju mehanizme odgovora na stres kako bi se ponovo uspostavila homeostaza i zaštitili ili popravili oštećeni proteini membrane, lipidi, itd. Istovremeno dolazi i do promena u sekundarnom metabolizmu biljaka. Neadekvatan odgovor na jednom ili više koraka u signalnom putu i aktivaciji gena može dovesti do ireverzibilnih promena ćelijske homeostaze i do destrukcije funkcionalnih i strukturnih proteina i membrane, dovodeći do ćelijske smrti. Skraćenice: SOD-superoksid dismutaza; PX- peroksidaze; HSP- proteini toplotnog šoka (eng. *heat shock protein*); LEA- LEA proteini (eng. *late embryogenesis abundant protein*). Shema je modifikovana po Wang i sar., 2003.

Veliki broj ovih gena su indukovani u uslovima biotičkog kao i abiotičkog stresa, što ukazuje na izrazitu kompleksnost kako odgovora, tako i adaptacije biljaka na stres (Mantri i sar., 2012; de Oliveira i sar., 2013). Novi nivo kompleksnosti u razumevanju odgovora biljaka na abiotički stres dodat je nakon otkrića da mikroRNK (miRNK) regulišu ekspresiju gena i da je nekoliko miRNK pozitivno ili negativno regulisano pod dejstvom abiotičkog stresa ukazujući da su uključene u ekspresiju gena i adaptaciju na stres tako što utiču na različite ćelijske i fiziološke procese (Sunkar i Zhu, 2004; Patade i Suprasanna, 2010; Mantri i sar., 2012).

Visok nivo produkcije sekundarnih metabolita u biljkama se obično javlja pod uslovima značajnog fiziološkog ili biohemijskog stresa. Upotreba stresogenih faktora u cilju povećanja produkcije ili indukcije *de novo* sinteze sekundarnih metabolita se široko koristi u *in vitro* kulturama biljnih ćelija, tkiva i organa (Karuppusamy, 2009; Ramakrishna i Ravishankar, 2011).

1.2.4.1. Povreda

Povreda je uobičajeno oštećenje biljaka koje nastaje kao rezultat abiotičkih faktora stresa kao što su vetar, kiša, grad ili biotičkih faktora, tokom napada herbivora (Cheong i sar., 2002). Povređivanje predstavlja konstantnu pretnju za opstanak biljaka jer tada ne dolazi samo do fizičkog uništavanja biljnog tkiva, već se otvara i put za invaziju patogena (Delessert i sar., 2004). Po Delessert i saradnicima (2004), u cilju zaštite od povreda, biljke su razvile složene prirodne odbrambene mehanizme kao što su formiranje fizičke barijere putem lignifikacije, formiranje kutikule, trnja i trihoma (Wagner i sar., 2004; Freeman i Beattie, 2008), proizvodnja toksičnih komponenti poput alkaloida (Baldwin i sar., 1998) i tanina (Scalbert, 1991). Odgovor biljaka na povređivanje uključuje oporavak oštećenog tkiva, produkciju jedinjenja koja ograničavaju hranjenje herbivora (Peña-Cortés i sar., 1991), zaštitu od naknadne infekcije oportunističkih patogena, kao i usklađivanje metabolizma biljaka kako bi se nosila sa svim nastalim promenama (Delessert i sar., 2004).

U odgovoru biljke na povredu učestvuju mobilni signali, koji mogu biti električne hidraulične ili hemijske prirode (Wildon i sar., 1992; Malone i Alarcon, 1995; Herde i sar., 1999; Ryan, 2000). Pored jasmonske kiseline, za koju se smatra da ima centralnu

ulogu u biljnom odgovoru na povređivanje, i druga jedinjenja (oligopeptid sistemin, oligosaharidi i fitohormoni poput abscisinske kiseline i etilena) imaju ulogu u signalizaciji nakon povrede (León i sar., 2001). Različiti putevi signalne transdukcije (zavisni i nezavisni od jasmonske kiseline) su identifikovani i delimično okarakterisani (León i sar., 2001; Arimura i sar., 2011). Komponente ovih signalnih puteva uglavnom su slične onima iz drugih signalnih kaskadnih puteva eukariota, i uključuju korake reverzibilne proteinske fosforilacije, Ca^{2+} /kalmodulin – regulisane korake kao i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS; eng. *reactive oxygen species*; León i sar., 2001; Arimura i sar., 2011; **Slika 4**). Dalja indukcija odbrambenih odgovora uglavnom zavisi od transkripcione aktivacije određenih gena (Reymond i sar., 2000; León i sar., 2001), a proteini koji su kodirani ovim genima imaju jednu od sledećih funkcija: 1) učestvuju u popravci oštećenog biljnog tkiva, 2) učestvuju u proizvodnji supstanci koje inhibiraju rast predatorskih insekata, 3) aktiviraju signalne puteve odbrane, ili 4) učestvuju u usklađivanju metabolizma biljke sa nametnutim novonastalim promenama (León i sar., 2001). Svi ovi procesi dovode do ozdravljenja oštećenog tkiva i aktivacije odbrambenih mehanizama koji treba da spreče dalja oštećenja (León i sar., 2001).

Odgovori biljaka na mehaničke povrede mogu biti kratkoročni i dugoročni. Kratkoročni odgovor počinje u minutima nakon povređivanja, dok se dugoročni odgovor javlja 6 i više sati nakon mehaničke povrede (Reymond i sar., 2000). Kratkoročni odgovor se javlja i u nepovređenim delovima biljke i uključuje rano-indukovane gene (rane odbrambene gene) koji uglavnom kodiraju faktore signalne transdukcije i regulacije (Cheong i sar., 2002; Delessert i sar., 2004). Nasuprot tome, dugoročni odgovor nastaje na povređenom mestu i karakteriše ga ekspresija gena koji kodiraju proteine sa metaboličkom funkcijom, tj. onih koji su povezani sa fotosintezom, metabolizmom šećera, masti i ugljenika (Cheong i sar., 2002; Delessert i sar., 2004). Ovi geni se nazivaju kasni odbrambeni geni. Među njima su jasno izdvojeni i geni odgovorni za produkciju sekundarnih metabolita.

U radu sa *in vitro* kulturama do povreda biljaka dolazi tokom manipulacije biljnim materijalom kako u okviru subkultivacije, tako i tokom same postavke eksperimenata. Stoga je definisanje promena koje nastaju povredom biljaka u kulturi *in vitro* veoma važno zbog pravilnih postavki svih eksperimenata i tumačenja rezultata, ali i moguće upotrebe u cilju povećanja produkcije sekundarnih metabolita od značaja.

1.2.4.2. Vodni stres

Negativno dejstvo različitih abiotičkih faktora (suša, povećan salinitet zemljišta, ekstremno visoke temperature, itd.) dovodi do poremećaja u vodnom statusu biljke tj. do pojave vodnog stresa (Verslues i sar., 2006; Taiz i Zeiger, 2010). Suša se u širem smislu može definisati kao dugotrajni nedostatak vode u spoljašnjoj sredini. Međutim, postoje uslovi u kojima biljka ne može da usvaja vodu iz podloge iako je ona prisutna u zemljištu, i ovakvo stanje se naziva fiziološka suša (Nešković i sar., 2003). Smanjena dostupnost vode može se kvantitativno predstaviti kroz snižavanje vodnog potencijala (ψ_w) (Kramer i Boyer, 1995; Verslues i sar., 2006). Snižavanje ψ_w podloge otežava biljkama proces usvajanja vode, što dovodi do dehidracije biljaka, a u uslovima dugotrajnog vodnog stresa čak i do njihove smrti. U uslovima vodnog stresa dolazi do pokretanja brojnih odbrambenih mehanizama u biljci koji obuhvataju promene kako na ćelijskom nivou, tako i na nivou cele biljke (Verslues i sar., 2006) i mogu se podeliti na fiziološke, biohemijske, kao i odgovore na molekularnom nivou (de Oliveira i sar., 2013). Aktiviranje ovih mehanizama obezbeđuje biljci da izbegne gubitak vode, tako što će omogućiti dalje usvajanje vode iz podloge ili da toleriše snižen relativni sadržaj vode u tkivu (Verslues i sar., 2006). Međutim, kada stres postane intenzivan i kada biljka više ne može da održava balans između uzimanja i odavanja vode, za njeno funkcionisanje postaju veoma važni dodatni mehanizmi: izbegavanje i tolerancija na dehidraciju (Verslues i sar., 2006). Izbegavanje dehidracije obuhvata proces akumulacije određenih metabolita u biljnoj ćeliji (poput prolina ili glicin betaina), kao i proces očvršćavanja ćelijskog zida (Verslues i sar., 2006). U slučaju da biljke ne mogu da izbegnu dehidraciju tkiva dolazi do aktiviranja mehanizama koji će biljkama obezbediti toleranciju na sniženi sadržaj vode u ćeliji, koji se prvenstveno zasnivaju na zaštiti ćelijskih struktura od efekata dehidracije (Verslues i sar., 2006). U tom procesu najznačajnija uloga pripada proteinima, kao što su LEA proteini (Verslues i sar., 2006), a među njima dehidrinima. Dehidrini se akumuliraju u embrionima tokom kasnih stadijuma embriogeneze (sazrevanje i desikacija embriona). Njihovo prisustvo je ograničeno na mlade biljne organe i one u kojima se odigravaju brze ćelijske deobe ili elongacija (npr. vrhovi korenova, izdužena stabla, petiole; Rorat i sar., 2004; Hanin i sar., 2011). Akumulacija dehidrina je pozitivno korelisana sa tolerancijom na dehidraciju (Close i sar., 1993; Mohammadkhani i Heidari, 2008) i često su

konstantno eksprimirani u linijama koje su tolerantne na dehidraciju (Chen i sar., 2013). Ovi proteini učestvuju u zaštiti drugih makromolekula ili ćelijskih struktura i pomažu u održavanju integriteta ćelijskih membrana (Close i sar., 1993; Bray, 1997; Beck i sar., 2007).

U odgovoru na vodni stres dolazi i do izmenjene ekspresije velikog broja gena koji učestvuju u odgovorima na stres (Wang i sar., 2003). U datim uslovima povećana je ekspresija velikog broja gena koji kodiraju enzime i proteine koji kod tolerantnih biljaka obezbeđuju otpornost na vodni deficit (npr. akvaporini, LEA proteini, osmotin, enzimi koji učestvuju u sintezi raznih osmoprotektanata), kao i gena koji učestvuju u biosintezi ABA (**Slika 4**) koja ima važnu ulogu u indukovanju regulatornih proteina, kao i u regulaciji ekspresije funkcionalnih proteina kao što su već pomenuti LEA proteini (Piatkowski i sar., 1990; Ingram i Bartels, 1996; Bartels i Salamini, 2001). Drugi aspekt tolerancije na dehidraciju (kao i na druge abiotičke faktore) je kontrola nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta i ograničavanje oštećenja prouzrokovanih ROS (Verslues i sar., 2006).

Proces rehidracije dovodi do posebnih procesa u biljkama i predstavlja period kada dolazi do popravke fizičkih oštećenja i obnavljanja metaboličkih aktivnosti. Stoga u okviru proučavanja fenomena tolerancije na dehidraciju/desikaciju, poseban značaj ima i ispitivanje procesa do kojih dolazi tokom rehidracije (Sherwin i Farrant, 1996). Na osnovu paralelnih ispitivanja indukcije zaštitnih sistema tokom odgovora na dehidraciju/rehidraciju uočene promene su vidljive u nivou membranskih lipida (Quartacci i sar., 2002), sadržaju askorbata i glutationa (Sgherri i sar., 2004), aktivnosti antioksidativnih enzima (Veljović-Jovanović i sar., 2006; Veljović-Jovanović i sar., 2008, Jovanović i sar., 2011).

1.2.4.3. Produkcija sekundarnih metabolita i abiotički stres

Poznato je da akumulacija sekundarnih metabolita zavisi od abiotičkih faktora poput temperature, svetlosnog režima i dostupnosti hranljivih materija (Gleadow i Woodrow, 2002; Demetzos i sar., 2002; Falk i sar., 2007; Ballhorn et al, 2011). Nepovoljniji uticaji spoljašnje sredine u velikoj meri utiču na metaboličke puteve odgovorne za produkciju i akumulaciju sekundarnih metabolita (Bohnert i sar., 1995;

Ramakrishna i Ravishankar, 2011; Selmar i Kleinwächter, 2013a,b). Promene (najčešće povećanje) u produkciji sekundarnih metabolita pod uticajem stresogenih faktora su i očekivane imajući u vidu da ova grupa jedinjenja ima važnu zaštitnu ulogu u odgovoru na biotički i abiotički stres (Selmar, 2008; Ramakrishna i Ravishankar, 2011; Liu i sar., 2011; Selmar i Kleinwächter 2013a, b).

U brojnim istraživanjima detektovano je povećanje sinteze i akumulacije različitih vrsta sekundarnih metabolita pod uticajem različitih stresogenih faktora. Suša dovodi do povećanja sadržaja epikatehina u vrsti *Camellia sinensis* (Hernández i sar, 2006), antocijanina kod *Vitis vinifera* (Castellarin i sar., 2007), ruzmarinske kiseline kod *Salvia miltiorrhiza* (Liu i sar., 2011), karotenoida kod *Helianthus annuus* (Ghobadi i sar., 2013). Povreda indukuje povećanje sadržaja monoterpena i sesviterpena u biljci *Gossypium hirsutu* (Opitz i sar., 2008), a kod *Quercus ilex* je usled povišene temperature povećana akumulacija monoterpena (Loreto i sar., 1998). Međutim, stresogeni faktori mogu dovesti i do smanjenja sinteze i akumulacije sekundarnih metabolita. Tako npr. u uslovima suše dolazi do smanjenja sadržaja saponina u biljci *Chenopodium quinoa*, (Soliz-Guerrero i sar., 2002), kao i određenih terpena kod *Melissa officinalis* i *Salvia officinalis* (Manukyan, 2011). Zapravo stresogeni faktori mogu dovesti do inaktivacije ili pojačane aktivnosti različitih metaboličkih puteva što rezultuje u kvalitativnim i/ili kvantitativnim promenama u produkciji biljnih metabolita. Ove promene su specifične i zavise od prirode abiotičkog ili biotičkog stimulusa koji može da specifično aktivira ili suprimira ekspresiju gena i indukuje ili blokira tačno određena mesta u metaboličkim putevima, ili čak da dovede do katabolizma odbrambenih jedinjenja (Jahangir i sar., 2009). Pojedina istraživanja metaboličku osnovu promene u produkciji sekundarnih metabolita indukovanu stresom objašnjavaju na sledeći način: zbog zatvaranja stoma usled početnog npr. vodnog deficita, unos CO₂ značajno opada. Kao rezultat, potrošnja redukcionih ekvivalenata (NADPH+H⁺) neophodnog za fiksaciju CO₂ putem Kalvinovog ciklusa značajno opada, dovodeći do ogromne prezasićenosti sa NADPH+H⁺. Veliko povećanje u redukcionom potencijalu (odnos NADPH+H⁺ prema NADP⁺), po zakonu o dejstvu masa (Guldberg-Vageov zakon), dovodi do pojačane sinteze visoko redukovanih jedinjenja poput izoprenoida fenola ili alkaloida (Selmar i Kleinwächter 2013a, b).

Funkcija terpenskih jedinjenja u odbrani biljaka od nepovoljnih uslova spoljašnje sredine je raznovrsna. Karotenoidi iz familije ksantofila, kao i neki drugi terpenoidi poput izoprena ili α -tokoferola u uslovima stresa izazvanog sušom i visokom temperaturom, stabilizuju i fotozaštićuju lipidnu fazu tilakoidnih membrana (Havaux, 1998; Sharkey, 2005, Velikova i sar., 2005). Ksantofili imaju ulogu i u detoksifikaciji ćelije od slobodnih radikala i ROS čiji je nastanak uzrokovan visokim intenzitetom svetlosti (Demming-Adams i Adams, 1996; Niyogi i sar., 1997; Munné-Bosch i Alegre 2000). α -tokoferol je takođe važan antioksidans (Foyer i Noctor, 2005; Abbasi i sar., 2007), dok izopren i α -pinen omogućavaju biljkama da prevaziđu stres izazvan visokom temperaturom (Peñuelas i sar., 2005). Pretpostavlja se da endogena produkcija izoprena štiti biološke membrane od oštećenja tako što ovo jedinjenje direktno reaguje sa singlet kiseonikom putem izopren-konjugat dvostruke veze (Velikova i sar., 2005). Loyola i saradnici (2012) su ukazali da terpenska jedinjenja sintetisana u plastidima ćelija paradajza imaju ulogu u odgovoru na vodni stres.

Značajan uticaj na ekspresiju gena MEP i MVA puta imaju faktori iz spoljašnje sredine poput osmotskog stresa, dehidracije, visoke i niske temperature, povreda, patogena, elicitora gljiva (Phillips i sar., 2007; Vranová i sar., 2013). Izlaganje svetlosti indukovalo je ekspresiju svih gena MEP puta (Hsieh i sar., 2008), dok je neznatno povećanje ekspresije *HMGR*, *DXR*, *CMK*, *IPP*, *FPPS*, *GGPPS* i *DXS* gena, čiji produkti predstavljaju važne enzime MVA i MEP puta biosinteze terpena, uočeno kada su biljke izlagane povišenoj temperaturi (Sasaki i sar., 2007; Pateraki i Kanellis, 2010). Druge studije su pokazale da se ekspresija gena *HMGR*, *IPPI*, *SQS* (skvalen sintaza), *NCED* (9-cisepoksikarotenoid dioksigenaza) i *GGPPS* menja kada su biljke izložene različitim stresnim uslovima (Qin i Zeevaart, 1999; Iuchi i sar., 2001; Nakamura i sar., 2001; Pateraki i Kanellis, 2010; Falara i sar., 2010; Loyola i sar., 2012).

Važno je istaći da su enzimi kako MVA, tako i MEP biosintetskog puta kodirani genskim familijama pri čemu različiti geni iste familije imaju različitu ekspresiju u tkivima i organima, kao i pod uticajem različitih faktora spoljašnje sredine. Smatra se da postojanje multigenskih familija ima važan uticaj na regulaciju ova dva biosintetska puta jer svaki gen član ovih familija može biti uključen u biosintezu određenog produkta i može podleći nezavisnoj regulaciji pod uticajem različitih faktora stresa (Cordoba i sar., 2009; Vranová i sar., 2013). Deo razlika između srodnih biljnih vrsta

koje se javljaju pri toleranciji na stres može nastati na nivou regulacije gena koji kodiraju regulatorne enzime oba sintetska puta terpena (Loyola i sar., 2012). Biljne vrste, pa i genotipovi unutar iste vrste mogu da se razlikuju u sposobnosti prevazilaženja stresnih uslova (Wahid i sar., 2007; Pavarini i sar., 2012). Shodno tome i specifična uloga sekundarnih metabolita u povećanju tolerancije na stres se takođe razlikuje. Dalja razjašnjenja su neophodna kako u cilju produkcije tolerantnih biljaka, tako i u cilju povećanja prinosa i produkcije sekundarnih metabolita od značaja.

1.3. Biološka aktivnost sekundarnih metabolita

Zahvaljujući značajnim biološkim aktivnostima biljni sekundarni metaboliti se koriste vekovima u tradicionalnoj medicini. Analgetici (npr. morfin), antitusici (npr. kodein), antihipertenzivi (reserpin), kardiotonici (digoksin), antineoplastici (vinblastin i paklitaksel), antimalarici (artemisin) su samo neka jedinjenja od nekoliko nezamenljivih medicinskih produkata biljnog porekla (Nessler, 1994).

1.3.1. Antimikrobna aktivnost

Razvoj antibiotika tokom XX veka je značajno smanjio opasnost od infektivnih bolesti koje izazivaju bakterije. Međutim, tokom godina intenzivnog korišćenja došlo je do smanjenja osetljivosti mikroorganizama na postojeće antimikrobne agense, kao i do razvića i širenja različitih mehanizama rezistencije bakterija na konvencionalne antibiotike (Bandow i sar., 2003; Westh i sar., 2004; Wright, 2010). U cilju poboljšanja efikasnosti antibiotika glavna istraživanja u okviru farmaceutske industrije su fokusirana na izmene molekulske strukture već postojećih antibiotika. Prirodna jedinjenja predstavljaju važan izvor novih lekova u terapijama mnogih bolesti, među kojima su i bolesti izazvane patogenim mikroorganizmima (Nascimento i sar., 2000; Sakagami i Kajimura, 2002; Clardy i Walsh, 2004). Zahvaljujući svojoj dostupnosti, različitosti vrsta, kao i izboru koji se može izvršiti na osnovu etnomedicinske upotrebe, lekovite i aromatične biljke trenutno privlače najveću pažnju farmaceutske i naučne zajednice (Hoet i sar., 2004; Ginsburg i Deharo, 2011; Savoia, 2012). Antimikrobni efekat etarskih ulja i ekstrakata biljaka omogućio je njihovu višestruku primenu uključujući upotrebu u alternativnoj medicini i prirodnom lečenju, kao i u konzerviranju

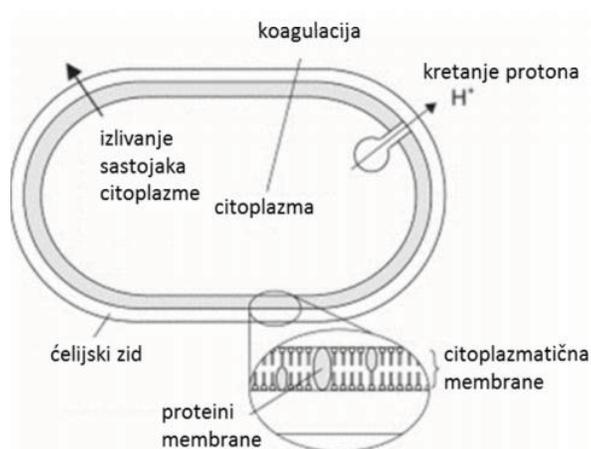
hrane, pored već pomenute upotrebe u farmaceutskoj industriji (Savoia, 2012). U brojnim istraživanjima koja su sprovedena tokom poslednjih decenija definisani su najvažniji sastojci biljaka koji poseduju antimikrobnu aktivnost (**Tabela 1**).

Tabela 1. Primeri klasa biljnih jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem (Cowan, 1999)

Klasa	Podklasa	Primer	Mehanizam delovanja
Fenolna jedinjenja	Jednostavni fenoli	Katehol Epikatehin	Lišavanje supstrata Oštećenje membrane
	Fenolne kiseline Hinoni	Cimetna kiselina Hipericin	Vezivanje za adhezin, vezivanje za ćelijski zid, inaktivacija enzima
	Flavonoidi Flavoni	Hrizin Abisinon	Vezivanje za adhezin, vezivanje za ćelijski zid Inaktivacija enzima, inhibicija HIV reverzne transkriptaze
	Tanini	Elagitanin	Vezivanje za adhezin, vezivanje za ćelijski zid, inhibicija enzima, lišavanje supstrata, oštećenje membrane, kompleksiranje sa jonima metala
	Kumarini	Varfarin	Interakcija sa eukariotskom DNK
Terpeni, etarska ulja		Kapsaicin	Oštećenje membrane
Alkaloidi		Berberin Piperin	Ugrađivanje u ć.zid i/ili DNK
Lektini		Manoza- specifičan aglutinin Fabatini	Blokiranje fuzije i adsorpcije virusa Formira disulfidne mostove

Iako su antibakterijska svojstva etarskih ulja i ekstrakata biljaka, kao i njihovih pojedinačnih sastojaka ispitana (Shelef, 1983; Nychas, 1995; Burt, 2004), još uvek ne postoji potpuno i zadovoljavajuće objašnjenje mehanizma antimikrobnog delovanja (Lambert i sar., 2001; Burt, 2004). Uzimajući u obzir veliki broj različitih grupa hemijskih jedinjenja prisutnih u biljnim ekstraktima i etarskim uljima, njihova antibakterijska aktivnost često se ne može pripisati samo jednom specifičnom

mehanizmu. Ove supstance obično ispoljavaju svoju aktivnost na više različitih načina (Skandamis i sar., 2001; Carson i sar., 2002). Mehanizam delovanja jedinjenja iz biljnih ekstrakata i etarskih ulja se generalno povezuje sa destabilizacijom citoplazmatske membrane, narušavanjem elektrohemijskog gradijenta, destabilizacijom prenosa protona, protoka elektrona, aktivnog transporta i koagulacijom citoplazme (Slika 5) (Burt, 2004, Savoia, 2012). Važna karakteristika etarskih ulja i njihovih komponenti je da su hidrofobni i da kao takvi narušavaju strukturu lipida koji ulaze u sastav citoplazmatske membrane bakterija, čineći je na taj način poroznom i lako propustljivom za različite molekule (Sikkema i sar., 1994; Alviano i Alviano, 2009).



Slika 5. Mesta i mehanizmi delovanja etarskih ulja i njihovih komponenti na bakterijsku ćeliju: degradacija ćelijskog zida, oštećenje citoplazmatske membrane, oštećenje proteina membrane; izlivanje ćelijskog sadržaja, koagulacija citoplazme i onemogućavanje kretanja protona (modifikovano po Burt i sar., 2004)

Povećan broj infekcija izazvanih gljivama kod ljudi, posebno kod imunokompromitovanih pacijenata (inficirani HIV-om, oboleli od kancera, pacijenti sa transplantiranim organima), kao i određeni nedostaci konvencionalnih mikotika (toksičnost, rezistenost pojedinih gljiva, efikasnost, cena) uticali su na povećano interesovanje za nove terapijske pristupe, prvenstveno za korišćenje biljnih jedinjenja (Savoia, 2012). Mehanizam antifungalnog dejstva jedinjenja iz biljnih ekstrakata i etarskih ulja nije dovoljno razjašnjen i pretežno se pripisuje njihovoj sposobnosti da poremete permeabilnost plazma membrane (Arif i sar., 2009; Savoia, 2012).

Antifungalna aktivnost određenih biljnih jedinjenja pored uticaja na plazma membranu, može se pripisati i izmenjenoj akumulaciji ROS u mitohondrijama (Tian i sar., 2012), kao i poremećaju homeostaze masnih kiselina usled interefrencije sa putevima njihove biosinteze i degradacije (Xu i sar., 2012).

Antimikrobna aktivnost biljnih ekstrakata ili etarskih ulja generalno zavisi od njihovog sastava koji varira usled uslova spoljašnje sredine (Burt, 2004; Savoia, 2012). Na antimikrobnost utiču i međusobne inetrakcije komponenti (Dorman i Deans, 2000; Marino i sar., 2001; Delaquis i sar., 2002), koje mogu imati aditivni, antagonistički ili sinergistički efekat (Burt, 2004). Etarska ulja ili biljni ekstrakti ponekad imaju veću antimikrobnost od smeše glavnih sastojaka (Gill i sar., 2002; Mourey i Canillac, 2002), što navodi na zaključak da i komponente prisutne u maloj količini mogu imati sinergistički i stimulatívni uticaj (Burt, 2004).

1.3.2. Antioksidativna aktivnost

Po osnovnoj definiciji, slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, što dovodi do njihove izražene reaktivnosti (Cadenas i Davies, 2000; Gill i Tuteja, 2010). Radikali koji imaju nesparen elektron na kiseonikovom atomu pripadaju grupi reaktivnih kiseoničnih vrsta (Halliwell, 2006). U ovu grupu se ubrajaju: superoksid radikali ($O_2^{\cdot-}$), perhidroksi radikal (HO_2^{\cdot}), hidroksil radikal (OH^{\cdot}) i alkoksi radikali (RO^{\cdot}). Ovoj grupi jedinjenja pripadaju i neke neradikalne vrste koje sadrže kiseonik poput vodonik peroksida (H_2O_2) i singlet kiseonika (1O_2) (Halliwell, 2006, Gill i Tuteja, 2010). Pored ROS značajne grupe slobodnoradikalnih jedinjenja predstavljaju i reaktivne vrste hlora (eng. *reactive chlorine species*, RCS), broma (eng. *reactive bromine species*, RBS) i azota (eng. *reactive nitrogen species*, RNS; Halliwell, 2006).

Slobodni radikali neprekidno nastaju kao rezultat brojnih metaboličkih procesa u živim ćelijama. U normalnim uslovima, homeostaza slobodnih radikala regulisana je antioksidansima prisutnim u organizmu. Neravnoteža između nastalih slobodnih radikala i antioksidanasa dovodi do oksidativnog oštećenja makromolekula ćelije kao što su membranski lipidi, nukleinske kiseline, ugljeni hidrati i proteini (Aruoma, 1998, Lefer i Granger, 2000; Bhatia i sar., 2003). Ova oštećenja nastala kao posledica

oksidativnog stresa mogu biti uzrok brojnih oboljenja poput kancera, neurodegenerativnih i imunih bolesti, dermatitisa, degenerativnih bolesti oka, određenih oblika dijabetesa, degenerativnih bolesti lokomotornog i kardiovaskularnog sistema (Gerber i sar., 2002, Di Matteo i Esposito, 2003, Halliwell i Gutteridge, 2007).

Halliwell i Gutteridge (2007) pod antioksidansima u širem smislu podrazumevaju agense koji onemogućavaju, spečavaju ili uklanjanju oksidativna oštećenja ciljanog molekula. Antioksidansi su jedinjenja ili sistemi koji ispoljavaju svoju aktivnost tako što inhibiraju formiranje slobodnih radikala ili prekidaju propagaciju slobodnih radikala i to putem nekoliko mehanizama: sprečavanjem formiranja peroksida, prekidanjem lančane reakcije oksidacije, smanjem lokalne koncentracije kiseonika, heliranjem metalnih jona itd.(Nawar, 1996; Brewer, 2011).

Antioksidansi koji se u organizam unose putem hrane ili lekova predstavljaju egzogene antioksidanse koji mogu biti sintetički ili prirodni. U prehrambenoj industriji se upotrebljava veliki broj sintetičkih antioksidanasa kao što su butilovani hidroksitoluen, butilovani hidroksianisolen, askorbil-palmitat i propil-galat (Brewer, 2011). Ova jedinjenja mogu imati negativne i/ili toksične efekte (Grice, 1988, Wichi, 1986; Brewer i Prestat, 2002; Rojas i Brewer, 2008), pa se stoga sve veća pažnja poklanja prirodnim antioksidansima, prvenstveno poreklom iz biljaka, a među njima se, kao jedinjenja koja imaju veliki antioksidativni potencijal, posebno ističu vitamin C i E, fenolne kiseline (galna, kafeinska, hlorogena, ruzmarinska kiselina), flavonoidi (kvercetin, katehin), karotenoidi (likopen), kao i konstituenti etarskih ulja i rezina (Shan i sar., 2005; Brewer, 2011).

Efikasnost antioksidanasa poreklom iz biljaka povezana je sa oksido/redukcionim potencijalom, rastvorljivošću i stabilnošću samog antioksidansa (Nawar, 1996). Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina zavisi od broja i pozicije hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilne grupe (Balasundram i sar., 2006), dok antioksidativno delovanje flavonoida zavisi od prirode supstituenata na prstenovima, pogotovo B prstena (Balasundram i sar., 2006; Wojdyło i sar., 2007; Lupea i sar., 2008). Izoprenoidi (među njima najveću antioksidativnu aktivnost imaju karotenoidi i abietanski diterpeni) su generalno lipofilniji od većine fenilpropanoidnih polifenola, pa se stoga njima pridaje veći značaj u zaštiti membranskih lipida (Matkowsky, 2008). Fenolna jedinjenja su se

pokazala kao bolji antioksidansi prilikom upoređivanja antioksidativnog potencijala fenolnih jedinjenja i terpena (Bramley i sar., 2000, Pietta, 2000, Kim i Lee, 2004, Asard i sar., 2004). Postojanje antagonističkog efekta između fenolnih jedinjenja i terpena pokazano je od strane nekoliko autora. (Azza i sar., 2011, Perry i sar., 2003).

Biljni ekstrakti s izrazitom antioksidativnom aktivnošću u testovima *in vitro* pokazuju aktivnost i u *in vivo* uslovima (Alam i sar., 2013), pa se *in vitro* metode sve više koriste kao prvi korak u ispitivanju potencijalne antioksidativne aktivnosti nekog biljnog ekstrakta ili jedinjenja.

1.3.3. Antikancerogena aktivnost

Kancer je bolest u kojoj dolazi do nekontrolisanog rasta i širenja u organizmu abnormalnih formi ćelija nastalih u telu obolelog (Karp, 1999; Rang i sar., 2007). Kancer je jedan od glavnih uzroka smrti u razvijenim zemljama i prema predviđanjima 2020. godine biće evidentirano 15 miliona novih slučajeva (Brayand i Moller, 2006; Zinov'eva i Spasov, 2011).

Maligne ćelije poseduju, više ili manje, četiri karakteristike koje ih odvajaju od normalnih ćelija: nekontrolisanu proliferaciju, dediferencijaciju i gubitak funkcije, invazivnost i metastaziranje. Abnormalne karakteristike malignih ćelija posledica su izmenjene genske ekspresije nastale usled različitih genskih mutacija koje mogu biti stečene*, ili nasledne (Rang i sar., 2007). Razvoj kancera je složen, višestepeni proces, koji ne uključuje samo jednu genetsku promenu već obično više njih, kao i učešće epigenetskih faktora (delovanje hormona, ko-karcinogena, promotera i dr.) koji sami po sebi ne predstavljaju uzrok kancera, ali povećavaju verovatnoću da genske mutacije rezultiraju kancerom (Rang i sar., 2007). Dve osnovne kategorije genskih promena (alteracija) dovode do kancera, a to su aktivacija proto-onkogena u onkogene i inaktivacija tumor supresornih gena (Talib, 2011). Ove promene su posledica tačkastih mutacija, amplifikacije gena ili translokacija hromozoma, i često nastaju kao posledica delovanja određenih virusa ili hemijskih karcinogena (Rang i sar., 2007).

* Ne nasleđuje se kancer sam po sebi, već mutirani gen i predispozicija za kancer. Primeri su tumor supresivni geni *BRCA1* i *BRCA2*: žene koje naslede mutaciju samo jednog gena imaju značajno veći rizik za oboljevanje od karcinoma dojke.

Visoka stopa smrtnosti među obolelima od kancera ukazuje na ograničenu efikasnost sadašnjih terapija (Xu i sar., 2009). Već dugi niz godina, naučnici pokušavaju da pronađu lek za kancer i u te svrhe koriste hemijski sintetisane ili prirodna čista jedinjenja (Talib, 2011). Većina antikancerskih lekova deluju antiproliferativno (dovode do oštećenja DNK time inicirajući apoptozu). Međutim, oni na isti način deluju i na normalne ćelije koje se brzo dele i tako oštećuju kosnu srž, usporavaju zarastanje rana, usporavaju rast, uzrokuju sterilitet, alopeciju, mogu biti i teratogeni, a većina uzrokuje mučninu i povraćanje (Rang i sar., 2007). Zbog teških nuspojava citostatika, istraživanja u poslednjih nekoliko decenija su usmerena ka korišćenju prirodnih proizvoda kao što su sirovi biljni ekstrakti ili upotreba kombinacije različitih biljnih jedinjenja u cilju lečenja kancera (Talib, 2011). Ovaj trend je baziran na osnovu sinergističkih efekata različitih biljnih metabolita u sirovim ekstraktima, kao i na postojanju više tačaka delovanja takvih ekstrakata (Neergheen, 2009; Talib, 2011). U okviru ispitivanja ukupno 187 biljnih vrsta (klasifikovane u 102 roda i 61 familiju) koje su identifikovane kao aktivni ili obećavajući izvori fitohemikalija za lečenje kancera, dokumentovano je trinaest različitih grupa prirodnih jedinjenja sa antitumorskim svojstvima (Kintzios, 2006). Među njima su najrasprostranjeniji i sa najbolje dokumentovanom aktivnošću fenilpropanoidi (18 familija), terpenoidi (14 familija) i alkaloidi (13 familija; Facchini, 2001; Trapp i Croteu, 2001b; Kintzios, 2006; Talib, 2011). Zahvaljujući višestrukom načinu delovanja, biljni ekstrakti i jedinjenja biljnog porekla učestvuju kako u prevenciji i sprečavanju, tako i u lečenju kancera. Antitumorska aktivnost ovih jedinjenja primarno je bazirana na njihovoj citotoksičnosti i mogu se izdvojiti dve glavne grupe biljnih jedinjenja: ona koja se vezuju za tubulin (destabilizujući ili stabilizujući mikrotubule) i ona koja inhibiraju enzime DNK topoizomeraze (Nobili i sar., 2009). Tako npr. alkalodi izolovani iz *Catharanthus roseus* (npr. vinkristin i vinblastin) sprečavaju stvaranje deobnog vretena i zaustavljaju ćelije u metafazi, vezujući se za tubulin i inhibirajući njegovu polimerizaciju u mikrotubule (Nobili i sar., 2009), dok taksani, koji su inicijalno izolovani iz *Taxus brevifolia*, a danas se dobijaju i semisintetičkim putem iz 10-deacetilbakatil III izolovanog *Taxus baccata*, deluju na mikrotubule tako što ih stabilizuju u polimerozovanom stanju (Horwitz i sar., 1993). U drugu grupu biljnih produkata sa antikancerogenim delovanjem se ubrajaju kamptotecini iz *Camptotheca acuminata* koji inhibiraju topoizomerazu I, kao i podofilotoksini (npr. etopozid)

izolovani iz korena mandragore (*Podophyllum peltatum*) koji inhibiraju topoizomerazu II (Nobili i sar., 2009). Za podofilotoksine se smatra da inhibiraju funkciju mitohondrija i transport nukleotida (Rang i sar., 2007). Međutim, neki biljni produkti deluju i na druge načine. Tako npr. flavonoidi iz *Scutellaria biacalensis* deluju na ciklin zavisne kinaze (Dai i Grant, 2003; Chang i sar., 2004), ali u većim koncentracijama pokazuju i citotoksičnu estrogen-sličnu aktivnost (Nair i sar., 2004; Oh i Chung, 2004; Woo i sar., 2005). Homoharringtonin, alkaloid izolovan iz *Cephalotaxus harringtonia*, inhibira proteinsku sintezu blokirajući progresiju ćelijskog ciklusa (Nobili i sar., 2009). Stilben kombretstatin A4, izolovan iz *Combretum caffrum*, inhibira rast krvnih sudova tumora, dovodeći do smrti i nekroze tumorskih ćelija (Banerjee i sar., 2008). Imajući u vidu da rezistencija na brojne lekove još uvek predstavlja jedan od najvećih problema u hemoterapiji, delovanje na proces angiogeneze predstavlja jedan od novih atraktivnih pravaca u razvoju antitumorskih lekova (Xu i sar., 2009).

Važno je napomenuti da jedinjenja poreklom iz biljaka pružaju veliku mogućnost ne samo u pronalaženju novih klasa antikancerogenih lekova, već i u otkrivanju novih i potencijalno značajnih mehanizama delovanja.

1.3.4. Biološka aktivnost labdanskih diterpena

Diterpeni labdanskog tipa pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti poput antimikrobne, antiinflamatorne, antikancerogene, antiproliferativne, uključujući i hepatoprotektivne, antihipertenzivne i bronhodilatatorne efekte, kao i efekte na enzimske sisteme sisara (inhibitori β -glukoronidaze, fosfolipaze A2, aktivatori adenilat ciklaza; Chinou, 2005).

Antimikrobna aktivnost LD obuhvata kako antibakterijsku tako i antifungalnu aktivnost. Epigomerična i gomerična kiselina, labdanski diterpeni izolovani iz nekoliko vrsta *Lamiaceae* (*Sideritis* sp.), pokazale su izvanrednu antibakterijsku aktivnost pogotovo prema Gram (+) bakterijama (Darias i sar., 1990). Sklareol, labdanski diterpen izolovan iz *Salvia palestina* je imao snažnu izraženu antimikrobnu aktivnost (Ulubelen i sar., 1985), kao i labdanski diterpeni iz *Salvia linearifolia* i *Premna olgotricha* (Habibi i sar., 2000; Habtemariam i sar., 1992). Sklareol, manool, kao i još dva labdanska diterpena izolovana iz *Salvia sclarea* inhibirala su rast *Staphylococcus aureus* (Ulubelen

i sar., 1994). *Juniperus procera* predstavlja izvor nekoliko labdanskih diterpena koji imaju snažnu aktivnost na *Mycobacterium* sp. (Muhammad i sar., 1996). Jedinjenja labdanskog tipa prisutna u etarskom ulju i rezinu *C. creticus* subsp. *creticus* i *C. creticus* subsp. *eriocephalus* poseduju značajnu antimikrobnu aktivnost kako na Gram (+) bakterije, tako i na nekoliko gljiva humanih patogena (*Candida albicans*) (Chinou i sar., 1994; Demetzos i sar., 1994; Anastasaki i sar., 1999). Takođe, metanolni ekstrakti *Cistus incanus* i *Cistus monspeliensis* u uslovima *in vitro* su pokazali snažnu inhibitornu aktivnost prema 5 vrsta bakterija i pet vrsta gljiva (Bouamama i sar., 1998). Smatra se da su upravo izomeri manoil oksida odgovorni za antimikrobnu aktivnost datih ekstrakata, pogotovo prema Gram (+) bakterijama (Demetzos i Dimas, 2001). Tokom istraživanja efekta etarskih ulja *Stachys chrysantha* i *Helichrysum rupestre* na rast Gram (+) i Gram (-) bakterija potvrđeno je da je visok sadržaj manoil oksida u ovim etarskim uljima povezan sa detektovanom antibakterijskom aktivnošću (Roussis i sar., 1998; Skaltsa i sar., 1999).

Veliki broj testiranih LD poseduje izuzetnu antiproliferativnu i citotoksičnu aktivnost. Tako rotundifuran izolovan iz ploda *Vitex rotundifolia* inhibira proliferaciju HL-60 ćelija (ćelije humane mijeloidne leukemije; Ko i sar., 2001). Epigomerična i gomerična kiselina, pored već pomenute antimikrobne, poseduje i citotoksičnu aktivnost u kulturi HeLa 229 ćelija (ćelije humanog kancera cerviksa) (Darias i sar., 1990). Citotoksični labdanski diterpeni izolovani iz *Baccharis gaudichaudiana* (Fullas i sar., 1994) inhibiraju rast ćelijske linije mišje leukemije (P-388) i rast KB ćelija kancera rezistentnih na vinblastin (KB-V1). Ovu veoma važnu citotoksičnu aktivnost u kulturi multirezistentnih ćelija karcinoma (ćelijske linije humane leukemije) pokazalo je još nekoliko vrsta labdanskih diterpena izolovanih iz heksanskog ekstrakta *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter & Burdet i *C. monspeliensis* (Demetzos i sar., 2001). Labdanski diterpeni izolovani iz srodnih vrsta *C. creticus* i *C. incanus*, takođe su pokazali citotoksičnu aktivnost prema velikom broju humanih ćelijam leukemije, ćelija karcinoma dojke ((MCF7), CNS (SF268), NSCL (NCI-H460), SLC (DMS114), prostate (PC-3), jajnika (OVCAR5), i kolona (HCT116) (Dimas i sar., 1999; Hatziantoniou i sar., 2006; Matsingou i sar., 2006). Među izolovanim labdanskim diterpenima sklareol i labd-13(E)-en-8 α ,15-diol su imali najveću citotoksičnu aktivnost (Demetzos i sar., 2001; Hatziantoniou i sar., 2006). Smatra se da ovi diterpeni ostvaruju svoje dejstvo

aktiviranjem apoptoze i to verovatno zaustavljenjem ćelija u G0/1 fazi ćelijskog ciklusa (Demetzos i Dimas, 2001). Takođe, veoma značajnu antikancerogenu aktivnost ima forskolin, labdanski ditrepena iz *Coleus forskholii*. Chen i saradnici (1998) su pokazali da forskolin indukuje apoptozu u A-172 ćelijama humanog glioblastioma. Zahvaljujući veoma jakom kombinovanom efektu forskolina sa lekovima mitomicinom C i/ili *cis*-diamindihlorplatinom (DDP) ovaj labdanski diterpen je predložen i za kombinovanu antitumorsku hemoterapiju (Miyamoto i sar., 1987; Mann i sar., 1991).

1.4. Opšte odlike vrste *Cistus creticus* L.

Rod *Cistus* (*Cistaceae*) sačinjava tridesetak vrsta karakterističnih za područje Mediterana, a vrste *C. monspelliensis*, *C. ladaniferus*, *C. salviifolius*, *C. laurifolius* i *C. albidus* su najčešće (Gaussen i sar., 1982). Ovaj rod pokazuje značajnu morfološku raznolikost (Greuter i sar., 1984), a zabeležene su i brojne hibridizacije između srodnih vrsta (Ellul i sar., 2002).

Cistus creticus L. (Slika 6) je višegodišnja žbunasta biljka koja dostiže visinu do 100 cm. Listovi su prosti, naspramno raspoređeni, jajolikog ili elipsastog oblika. Listovi i stabla poseduju glandularne trihome koje izlučuju smolu (rezin) uglavnom tokom letnjih meseci. Cveta tokom aprila i maja, a cvetovi su roze boje, veličine oko 4 cm i imaju 5 čašičnih listića (Sfikas, 1987). Plod je kapsula, a semena su sitna, braon boje (Warburg, 1968). Prema Flori Evrope sinonim za *C. creticus* L. je *Cistus incanus* L. subsp. *creticus* (L.) Heywood ili *Cistus villosus* (*incanus* = prosed, srebrnkast; *villosus* = dlakav). Indumentum listova *C. creticus* L. se sastoji od dva tipa trihoma: mehaničkih (neglandularnih) i glandularnih. Mehaničke trihome mogu biti viševićijske (stelatne), dok su glandularne kapitatnog tipa i dele se u dve vrste (Gülz i sar., 1996). Hemijska analiza ukupnog sadržaja svih trihoma *C. creticus* L. je ukazala da su glavna jedinjenja labdanski diterpeni. Hemijska analiza pojedinačnih trihoma do sada nije urađena.

Nedavno je konstruisana cDNK biblioteka specifična za trihome *C. creticus* L. (Falara i sar., 2008), a urađena je i izolacija, kloniranje i funkcionalna karakterizacija nekoliko cDNK koje kodiraju enzime uključene u biosintezu terpena (Pateraki i Kanellis, 2008, 2010; Falara i sar., 2008; 2010).

Smolu vrste *C. creticus* L., poznatiju pod nazivom „Ladano“, lokalno stanovništvo Krita sakuplja odavnina zbog izraženih aromatičnih i lekovitih svojstava

(Hegnauer, 1964). Analizama hemijskog sastava smole, kao i listova i stabla *C. creticus* je pokazno da diterpeni labdanskog tipa predstavljaju dominantna jedinjenja (Demetzos i sar., 1994, 1999, 2002; Anastasaki i sar., 1999), a prisutni su i drugi trepeni, polifenoli i flavonoidi. Izolovani labdanski diterpeni poput (13*E*)-labd-13-en-8a,15-diol, (13*E*)-labd-7,13-dien-15-ol, (13*E*)-labd-7,13-diene-15-il acetat, (13*E*)-labd-7,13-dienol, sklareol [(13*R*)-labd-14-en-8,13-diol], kao i derivati manoil oksida poseduju, u slobodnoj formi ili inkorporirani u liposome, antimikrobnu, kao i citotoksičnu aktivnost (Demetzos i sar., 1994; Dimas i sar., 1998; 1999; 2001; Matsingou i sar., 2006; Chinou i sar., 1994).



Slika 6. *Cistus creticus* L. **A)** izgled biljke (autor slike Barra A.) stabla i listovi gusto prekriveni trihomama što daje biljci srebrnkast, dlakav izgled, (slika pruzeta sa <http://luirig.altervista.org/flora/taxa/>) **C)** cvet karakteristične ružičaste boje (slika preuzeta sa <https://sbwildflowers.wordpress.com/wildflowers/cistaceae/cistus>)

Zbog svega do sada navedenog, istraživanja biosintetskih puteva i mehanizama regulacije produkcije ovih jedinjenja, kao i dalja proučavanja njihove biološke aktivnosti sve je aktuelnija (Pateraki i Kannelis, 2008; 2010; Munné-Bosch i sar., 2009; Falara i sar., 2010; Skorić i sar., 2012; Skorić i sar., 2013a).

2. CILJ

Predmet istraživanja ove disertacije bio je ispitivanje regulacije produkcije labdanskih diterpena u biljkama *Cistus creticus* L. gajenim *in vitro* pod uticajem različitih abiotičkih faktora i hranljivih podloga sa varirajućim sadržajem različitih ugljenih hidrata, a u cilju nalaženja optimalnih uslova za njihovu produkciju. Istovremeno, analizirana je i potencijalna biološka aktivnost dobijenih ekstrakata izdanaka i korena biljaka iz *in vitro* kulture i mogućnost njihove dalje primene.

Realizacija ovog cilja izvršena je kroz nekoliko zadataka:

- Uspostavljanje *in vitro* kulture izdanaka *C. creticus* L. kao model sistema i analiza nekoliko različitih klonova u cilju utvrđivanja postojanja razlika u parametrima rasteanja i razvića, kao i u produkciji sekundarnih metabolita.
- Histoheimijska analiza žlezdanih dlaka i određivanje akumulacije različitih jedinjenja u njima.
- Određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja labdanskih diterpena i fenolnih jedinjenja u biljkama iz *in vitro* kulture.
- Analiza efekata određenih abiotičkih faktora i ugljenih hidrata kako na ekspresiju odabranih gena uključenih u MEP i MVA biosintetski put terpena, tako i na nivo produkcije i akumulacije labdanskih diterpena.
- Transformacija *C. creticus* L. sa *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS, kao i analiza hemijskog sastava transformanata i ekspresije odabranih gena uključenih u MEP i MVA biosintetski put terpena
- Utvrđivanje biološke aktivnosti (citotoksične, antimikrobne i antioksidativne) biljnih ekstrakata *C. creticus* nakon hemijske analize njihovog sadržaja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Semena *Cistus creticus* L. subsp. *creticus* dobijena su od prof. dr Angelosa K. Kanellisa sa Aristotelovog Univerziteta u Solunu (Grčka). Uzorci semena se čuvaju na Odeljenju za biljnu fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu.

3.2. *In vitro* kultura *Cistus creticus*

Imbibovana semena tretirana su visokom temperaturom (95 °C) tokom 10 minuta, nakon čega su površinski sterilisana pomoću 20% rastvora komercijalnog preparata natrijum hipohlorita („Snežnik“, Panonija, Pančevo, Srbija), sa 4% aktivnog hlora, tokom 15 minuta. Semena su potom isprana tri puta sterilnom dejonizovanom vodom i prebačena na 1/2 MS hranljivu podlogu (Murashige i Skoog, 1962) koja je sadržala 100 mg/l myo-inozitola, 3% saharoze i 0,7% agara (Torlak, Beograd, Srbija). Pre sterilizacije na 114°C tokom 25 minuta, pH vrednost hranljive podloge je podešena na 5,8.

Nakon 15 dana formirani klijanci su prebacivani na MS hranljivu podlogu. Biljke su rasle u staklenim teglama zapremine 760 ml, sa polikarbonatnim zatvaračima i gajene u sobi za rast kultura na temperaturi od 25 ± 2 °C, u uslovima dugog dana (16/8 sati svetlo/mrak). Kao izvor svetlosti korišćene su bele fluorescentne lampe („Tesla“, Pančevo,) snage 60 W i gustine fotonskog fluksa 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Kulture izdanaka su obnavljane prenošenjem eksplantata (odsečaka izdanka sa po jednim nodusom i parom listova) na svežu MS podlogu, u akseničnim uslovima. Podloge, instrumenti za rad i laboratorijsko posuđe sterilisani su prema standardnim procedurama kulture biljaka *in vitro*, a rad sa biljnim materijalom obavljan je u akseničnim uslovima u laminarnoj komori („Termovent“, Užice).

3.3. Eksperimentalni dizajn

Uticaj različitih vrsta ugljenih hidrata

Eksplantati stari 4 nedelje su gajeni na čvrstoj MS hranljivoj podlozi u koju je dodavana saharoza, glukoza ili fruktoza u različitim ekvimolarnim koncentracijama (0,3 M; 0,1 M; 0,06 M; 0,03 M i 0,01 M). Šest nedelja od postavke eksperimenta mereni su sledeći parametri: broj nodusa i broj aksilarnih pupoljaka po eksplantatu, dužina nadzemnog dela izdanka, dužina korena, prosečan broj i dužina korenova i procenat ožiljavanja. Uzorci su sakupljeni i čuvani na - 80 °C do upotrebe. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta, sa 18 biljaka po ponavljanju.

Uticaj procesa dehidratacije i rehidratacije

Eksplantati iste starosti su prebacivani na tečnu 1/2 MS hranljivu podlogu bez saharoze u koju je dodavana različita količina PEG 8000 (polietilen glikol 8000, Sigma-Aldrich, Nemačka) kako bi se postigao vodni potencijal podloge od $\psi = -2$ MPa i $\psi = -5$ MPa. Nakon pet dana dehidratacije eksplantati su prebacivani na tečnu 1/2 MS hranljivu podlogu bez saharoze i dodatka PEG 8000 i gajeni narednih pet dana (proces rehidratacije). Svi eksplantati su gajeni su u Magenta kutijama zapremine 300 ml, sa po 50 ml podloge. (Slika 7).



Slika 7. Prikaz postavke eksperimenta dehidratacije/rehidratacije: eksplantati se nalaze u otvorima čeličnih nosača u Magenta kutijama i naliven je odgovarajući medijum: levo je dodat medijum sa dodatkom PEG 8000 ($\psi = -2$ MPa), desno medijum bez dodatka PEG 8000

Biljni materijal je sakupljan u pravilnim vremenskim intervalima (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 5 dana) tokom procesa dehidracije i rehidracije i čuvan na - 80 °C do upotrebe. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta, sa 18 biljaka po ponavljanju. Prilikom izračunavanja vodnog potencijala rastvora upotrebljavan je softverski paket (Giba Z., IBISS, Beograd) baziran na jednačini Michel (1983):

$$\Psi = 1.29 [\text{PEG}]^2 T - 140 [\text{PEG}]^2 - 4.0 [\text{PEG}],$$

[PEG] = g PEG/ g H₂O; T = +25°C.

Za izračunavanje relativnog sadržaja vode (RWC) u uzorcima korišćena je formula:

$$[(\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW})] * 100$$

FW - sveža masa uzorka posle tretmana rastvorom PEG 8000,

DW – suva masa uzorka,

TW – sveža masa hidratiranih uzoraka (posle inkubacije u dd H₂O tokom 24 h).

Uticaj povrede

Eksplantati stari 4 nedelje su prenešeni na MS čvrst medijum, a nakon 4 nedelje pristupilo se eksperimentima.

U eksperimentima uticaja povrede listovi formiranih izdanaka su povređivani zasecanjem makazama u pravilnim razmacima (5 mm) i zatim vraćani na medijum. Uzorci su sakupljeni u određenim vremenskim intervalima, tj. nakon 30 minuta, 1 h, 3 h, 6 h i 24 h. Kontrolne biljke nisu povređivane, a biljni materijal je prikupljan neposredno nakon tretmana i čuvan na – 80 °C do upotrebe.

3.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) omogućava izuzetno precizno istraživanje površinske strukture uzoraka. SEM nudi mogućnost uveličanja od 10 do čak

500 000 puta, a dobijena slika je trodimenzionalna. SEM skenira površinu preparata, a sliku oblikuje pomoću elektrona koji se odbijaju od spoljašnje površine preparata. Prilikom analize prisustva i strukture žlezdanih dlaka posmatrano je lice i naličje listova izdanaka *C. creticus* koji su gajeni u uslovima *in vitro*. Uzorci su bez prethodne fiksacije pripremljeni uobičajenom tehnikom nanošenja nanometarskog sloja provodnog materijala (Au), a zatim posmatrani na skenirajućem elektronskom mikroskopu (JEOL JSM-6390, SAD).

3.5. Histološke analize

3.5.1. Histoanatomska analiza korenova

Uzorci transformisanih korenova fiksirani su tokom 24 h u FAA fiksativu (formaldehid : sirćetna kiselina : alkohol, 10:5:85). Po završenoj fiksaciji, nakon ispiranja pod mlazom tekuće vode, materijal je postupno dehidriran sprovođenjem kroz seriju alkohola rastućih koncentracija. Radi prosvetljavanja tkiva, materijal je postupno sproveden kroz mešavinu 100%-nog alkohola i ksilola, sa rastućim udelom ksilola sve do čistog ksilola. Nakon toga je ksilol potpuno zamenjen paraplastom, na temperaturi od 59 °C. Materijal je ukalupljen u paraplastu i sečen na rotacionom mikrotomu (Reinhardt, Nemačka) na preseke debljine 10 µm. Preseci su, nakon deparafinacije i rehidratacije inkluzirani u kanada balsam i snimani na svetlosnom mikroskopu Leitz DMBR (Leica, Wetzlar, Nemačka).

3.5.2. Histoheмиjska karakterizacija trihoma

Histoheмиjska karakterizacija trihoma je urađena na ručno sečenim presecima svežih listova dužine 1,5 cm do 2 cm korišćenjem sledećih testova: Sudan IV za totalne lipide (Jensen, 1962); Nadi reagens za terpene (David i Carde, 1964) i fluorescentna mikroskopija pod UV svetlom za detekciju fenolnih jedinjenja (Mabry i sar., 1970). Uporedo su urađene standardne kontrole. Nakon inkluzije u glicerol, preparati su posmatrani i snimani na svetlosnom mikroskopu Axio Vert (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Nemačka).

3.6. Genetička transformacija *C. creticus*

Klijanci *C. creticus* stari 10 dana prebacivani su na 1/2 MS medijum. Po obrazovanju nekoliko pari listova izvršena je transformacija biljaka. Za transformaciju je korišćen soj *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS koji pripada agropinskom soju sa GUS konstruktom integrisanim u T_L regionu (između *rolC* i *rolD* gena) Ri A4 plazmida (Tepfer i Casse–Delbart, 1987). GUS konstrukt sadrži *uidA* sekvencu, 70S promotor (dupliran 35S CaMV (*cauliflower mosaic virus*) promotor) i NOS (nopalina sintetaza) poliadenilacionu sekvencu.

A. rhizogenes A4M70GUS je gajen na čvrstoj YEB podlozi (Vervliet i sar., 1975) u koju je dodat antibiotik neomicin (ICN Galenika, Srbija) u koncentraciji od 100 µg/ml. Nakon zasejavanja, kulture su gajene 24 h na temperaturi od 28 °C, a zatim na 4 °C. Bakterijske suspenzije, korišćene za inokulaciju biljaka, dobijene su zasejavanjem bakterijske kolonije u 5 ml tečnog YEB medijuma i inkubiranjem 48 h na temperaturi od 28 °C.

3.6.1. Transformacija i uspostavljanje kultura transformisanih korenova

Izdanci *C. creticus* su inokulisani ubodom hipodermalne igle, natopljene bakterijskom suspenzijom, u nivou internodija. Potencijalno transformisani korenovi su po dostizanju dužine od 10-15 mm odsecani sa eksplantata i prenošeni na osnovnu MS podlogu sa dodatkom 150 mg/l cefotaksima (Tolycar®, cefotaksim–Na, Jugoremedija, Zrenjanin, Srbija). Antibiotik je dodavan u sledeća tri pasaža radi potpune eliminacije bakterija. Ovako dobijeni individualni klonovi dalje su pasažirani i gajeni u tečnom MS medijumu.

3.6.2. Histohemijski test za određivanje aktivnosti enzima β-glukuronidaze

β-glukuronidaza (GUS) nije uobičajeni deo enzimskog komplekta viših biljaka. Zato se gen koji kodira ovaj enzim (*uidA*) uspešno koristi kao reporter gen (Jefferson i sar., 1987). Supstrat za β-glukuronidazu je 5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-glukuronska kiselina (X-Gluc). Produkt reakcije je dihloro-dibromo-indigo, nestabilno jedinjenje koje oksidativnom dimerizacijom daje ClBr-indigo, jedinjenje intenzivno plave boje

nerastvorljivo u vodi. Ovo jedinjenje precipitira odmah po formiranju, što omogućava preciznu lokalizaciju enzimske aktivnosti.

Histohemijsko bojenje potencijalno transformisanih i netransformisanih korenova je urađeno prema protokolu opisanom u radu Jefferson i saradnika (1987). Tri do pet vrhova korenova (5–10 mm dužine) svakog klona je inkubirano u 50 µl X–Gluc (Sigma, USA) rastvora (**Tabela 2**), pH 7 na 37 °C preko noći. Pojava plave boje, koja ukazuje na GUS ekspresiju, praćena je pod svetlosnim mikroskopom.

Tabela 2. Sastav reakcionog pufera za dokaz enzimske aktivnosti β-glukuronidaze

Komponente	Finalna koncentracija
NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Na ₂ EDTA	10,0 mM
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,5 mM
K ₄ [Fe(CN) ₆]	0,5 mM
X-Gluc	2,0 mM

3.6.3. Karakterizacija rasta transformisanih korenova

U cilju određivanja brzine rasta korenova uspostavljene su tečne kulture za svaki pojedinačni klon. U tu svrhu 500 mg sveže mase korenova (vršnih delova) iz četiri nedelje starih kultura preneto je u 50 ml tečnog MS (po šest Erlenmajera za svaki klon) i gajeno na šejkeru (70 rpm) na temperaturi od 25 °C. Nakon 4 nedelje korenovi su ocedeni na filter papiru i izmerena je njihova sveža masa. Indeks priraštaja težine netransformisanih i transformisanih korenova u MS tečnom medijumu bez regulatora rastenja je izračunat po formuli:

$$\frac{(t - t_0)}{t_0}$$

t₀ – početna težina korenova,

t – težina korenova posle 4 nedelje

3.6.4. Indukcija regeneracije pupoljaka na transformisanim korenovima

U cilju regeneracije izdanaka na transformisanim korenovima, vrhovi korenova (dužine 1 cm), odsecani su sa 4 nedelje starih kultura transformisanih korenova i prenošeni na čvrsti i tečni MS medijum sa dodatkom regulatora rastenja:

citokinina BAP (benzilaminopurin), TDZ (tidiaziron – 1-fenil-3-tidiazol-5-urea), KIN (kinetin – 6-furfuril-aminopurin), u koncentraciji 5, 10, 20 i 30 μ M.

auksina IAA (indol-3-sirćetna kiselina), NAA (α -naftalen sirćetna kiselina), 2,4-D (2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina) u koncentraciji 5, 10, 20 i 30 μ M.

citokinina/auksina BAP/NAA, BAP/IAA, TDZ/IAA i TDZ/NAA u odgovarajućim kombinacijama koncentracija od 5, 10, 20 i 30 μ M.

Uticaj regulatora rastenja na indukciju regeneracije je testiran na klonovima 1/2 i 17/1, a morfogenezne promene su praćene nedeljno.

3.6.5. Molekularna karakterizacija transformisanih korenova

Prisustvo T_L-DNK iz Ri plazmida u transformisanim korenovima *C. creticus* određeno je PCR amplifikacijom *uidA* gena.

Izolacija DNK

Izolacija ukupne genomske DNK iz potencijalno transformisanih korenova koji su pokazali pozitivnu GUS reakciju i iz jednog netransformisanog korena, urađena je pomoću modifikovane CTAB (heksadecil-trimetil-amonijum bromid) metode (Zhou i sar., 1994).

Izolacija je vršena tako što je 150 mg biljnog materijala samleveno u avanu u tečnom azotu. Sprašen biljni materijal je prenet u sterilne ependorf tubice i ekstrahovan u 0,6 ml CTAB ekstrakcionog pufera (20 mM Na-EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl i 2% (w/v) CTAB) sa 0,5% β -merkaptoetanolom). Nakon inkubacije uzoraka u vodenom kupatilu na 56 °C tokom 20 min, u svaku ependorf tubicu dodato je po 0,6 ml smeše hloroform : izoamilalkohol (24:1, v:v). Sadržaj je izmešan laganim okretanjem tubica gore-dole oko 40 puta. Uzorci su centrifugirani na 13000 g na sobnoj temperaturi tokom 10 min, a supernatant koji se odvajao u vidu gornje, bezbojne faze, prenošen je u nove ependorf tubice. Postupak hloroformske ekstrakcije je ponovljen još jednom, a

zatim je, radi precipitacije DNK, dodato po 0,25 ml 4 M NaCl i 0,75 ml hladnog izopropanola. Nakon inkubacije na +4 °C tokom narednih 30 minuta uzorci su centrifugirani 5 min na 8000 g na sobnoj temperaturi. Supernatant je odstranjen, a talog ispran dodavanjem 1 ml hladnog 70% etanola. Sadržaj je ponovo centrifugiran pod istim uslovima. Supernatant je odliven, a talog sušen u laminarnoj komori dok nije postao sasvim proziran. Resuspendovan je dodavanjem 0,2 ml TE pufera (1 mM EDTA, 10 mM TRIS, pH 8) i inkubiran na +4 °C tokom noći do potpunog rastvaranja. Uklanjanje RNK izvršeno je tretiranjem uzoraka sa po 0,5 µl RNK-aze (tip A, Thermo Scientific, Litvanija) i inkubacijom tokom 45 min u vodenom kupatilu na 37 °C, nakon čega je ponovljeno prečišćavanje smešom hloroform-izoamil alkohol.

Kvantifikacija izolovane DNK je određena spektrofotometrijski (spektrofotometar HP Agilent 8453, Waldbronn, Nemačka), posle razblaženja 1:100 u sterilnoj destilovanoj vodi. Na osnovu apsorbance (A) uzoraka na 260 nm, koncentracija DNK je izračunavana prema formuli:

$$\text{DNK koncentracija } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{faktor razblaženja}$$

Kvalitet izolovne DNK analiziran je elektroforezom na 1% agaroznom gelu (Sigma, St. Louis, Missouri, SAD), u 1 x TBE puferu (0,04 M Tris–borat; 0,001 M EDTA; 0,5 µg/ml etidijum–bromida), pri konstantnoj voltaži od 100 V u aparatu za horizontalnu elektroforezu BlueMarine™ 100 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka). Kao izvor napajanja korišćen je Standard Power Pack P25 (Biometra®, Göttingen, Nemačka). DNK je vizuelizovana na UV transiluminatorima: Quantum ST4 3026-WL/26M (Vilber Lourmat, Torcy, France) i gel–Doc™ EQ System (Life Science Research, Bio–Rad Co., SAD).

Uzorci DNA čuvani su na -80 °C do dalje upotrebe.

PCR analiza

Za PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) analizu i potvrdu prisustva transgena u biljnom tkivu korišćeni su oligonukleotidni prajmeri prikazani u **Tabeli 3**, koji amplifikuju fragment od 366 bp *uidA* kodirajućeg regiona.

Tabela 3. Sekvence prajmera *uidA* gena koji su korišćeni za PCR analizu

Gen	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'→3')	Dužina prajmera (b)	Dužina amplikona (bp)
<i>uidA</i>	GUS22	CCTGTAGAAACCCCAACCCGTG	22	366
	GUS392	CCCGGCAATAACATACGGCGTG	22	

Svaka PCR reakcija se odvijala u reakcionoj smeši zapremine 30 µl (**Tabela 4**) u PCR mašini (Techne Genius Thermocycler, Cambridge, UK) pod sledećim uslovima:

- 5 min 95 °C,
- 35 ciklusa: 1 min 95 °C, 1 min 62 °C, 2 min 72 °C i
- 10 min 72 °C.

Tabela 4. Sastav reakcione smeše pojedinačne PCR reakcije.

Komponente reakcione smeše za PCR reakciju	µl
10 x reakcioni pufer	3,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,8
dNTP (10 mM)	0,6
P1 (2 µM)	3,0
P2 (2 µM)	3,0
Taq polimeraza (5 U/µl)	0,5
DNK uzorka (100 ng/µl)	2,5
voda	15,6
ukupno	30,0

DNK izolovana iz netransformisanih korenova i listova *in vitro* biljaka *C. creticus* korišćena je kao negativna kontrola, a bakterijska DNK kao pozitivna kontrola.

Amplifikovani fragmenti su razdvojeni elektroforezom na 2% agaroznom gelu kao što je već opisano u odeljku 3.6.5, a vizuelizacija PCR produkata je vršena na transluminatoru (gel-Doc™ EQ System). Za utvrđivanje veličine fragmenta korišćen je DNK marker O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (TermoScientific, Litvanija).

3.7. Analiza ekspresije gena koji učestvuju u biosintetskom putu terpena

Biljni materijal je zamrzavan u tečnom azotu u sterilnim flakon tubama (Sarsted, Nemačka) i čuvan na - 80 °C do upotrebe. Izdanci su pre zamrzavanja odvajani od korenova.

3.7.1. Izolacija RNK

Izolacija ukupne RNK je izvršena uz korišćenje Spectrum™ Plant Total RNA Kit-a (Sigma–Aldrich®, Nemačka) po uputstvu proizvođača. Oko 100 mg biljnog materijala samleveno je u avanu u tečnom azotu i prebačeno u RNase–free sterilne ependorfice zapremine 2 ml koje su prethodno ohlađene na ledu. U svaki uzorak je dodato po 500 µl rastvora za liziranje (eng. *lysis solution*) sa dodatkom β–merkaptetanola. Ependorf tube su vorteksovane 30 s, a zatim su inkubirane 5 minuta na 56 °C. Potom su uzorci centrifugirani 3 min na 15000 g, kako bi se omogućilo taloženje nerastvornih ćelijskih fragmenata. Dobijeni supernatanti su profiltrirani kroz filtracione kolone (eng. *filtration column*) centrifugiranjem 1 min na 15000 g. U ove filtrirane lizate je dodato 500 µl vezujućeg rastvora (eng. *binding solution*), a zatim je dobijeni rastvor sipan u vezujuće kolone (eng. *binding column*) i centrifugiran 1 min na 15000 g. Pošto je RNK zadržana na membrani, filtrati su prosuti, a zatim je u kolonice dodato 500 µl rastvora za ispiranje 1 (eng. *wash solution 1*). Nakon centrifugiranja od 1 min na maksimalnom broju obrtaja, filtrati su odbačeni, a kolone su dva puta isprane rastvorom za ispiranje 2 (eng. *wash solution 2 concentrate*) koji prethodno razblažen sa četiri zapremine apsolutnog etanola. Dodavano je po 500 µl rastvora, a centrifugiranje je vršeno na 15000 g 30 sekundi. Centrifugiranjem na maksimalnom broju obrtaja u trajanju od 1 min izvršeno je sušenje uzoraka. Filtrati su prosuti, kolone su prenete u čiste RNA-se free ependorf tubice, u koje je RNK eluirana sa 50 µl rastvora za eluciju (eng. *elution solution*).

Kvalitet izolovane RNK verifikovan je elektroforezom u agaroznom gelu (vršena je kao i elektroforeza DNK opisana u odeljku 3.6.5) a određena je i spektrofotometrijski prema odnosu količnika A_{260}/A_{280} (za čistu RNK A_{260}/A_{280} iznosi 1,9-2,1). Kvantifikovanje RNK vršeno je na spektrofotometru (HP Agilent 8453, Waldbronn, Nemačka) i izračunavano je prema formuli:

$$\text{RNK koncentracija } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 40 \times \text{faktor razblaženja}$$

Izolovana ukupna RNK je čuvana na -80 °C do trenutka korišćenja.

3.7.2. Tretman dezoksiribonukleazom

U cilju uklanjanja ostataka genomske DNK totalna RNK iz svakog uzorka je tretirana DNK-azom (ThermoScientific, Litvanija). Ovaj tretman je vršen u reakcionoj smeši zapremine 10 µl (**Tabela 5**). Nakon tretmana u trajanju od 30 min na 37 °C, dodato je 1 µl 25mM EDTA (ThermoScientific, Litvanija) i reakciona smeša je inkubirana na 65 °C 10 min.

Tabela 5. Sastav reakcione smeše za tretman DNK-azom.

Komponenta reakcione smeše	µl
uzorak RNK (2 µg) u DEPC vodi	6,5
10 x reakcioni pufer sa MgCl ₂	1,0
DNKza I (1 U/µl)	2,0
inhibitor RNKze <i>RiboLock RI</i> (40 U/µl)	0,5
ukupno	10,0

3.7.3 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija RNK u jednolančanu DNK (cDNK) je vršena u PCR mašini (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, SAD) pomoću RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kita (ThermoScientific, Litvanija) i odvijala se na 42 °C u trajanju od 60 minuta. Reakcija je okončana zagrevanjem na 70 °C (5 min). Reakciona smeša zapremine 20 µl sastojala se od komponenti prikazanih u **Tabeli 6**.

Tabela 6. Sastav reakcione smeše pojedinačne RT reakcije.

Komponenta reakcione smeše	μl
RNK iz prethodnog koraka	11,0
oligo-dT prajmeri	1,0
5 x reakcioni pufer	4,0
inhibitor RNKze (20 U/ μl)	1,0
dNTP miks (10 mM)	2,0
reverzna transkriptaza (200 U/ μl)	1,0
ukupno	20,0

3.7.4. PCR amplifikacija

PCR amplifikacija je rađena uz korišćenje rekombinantne *Taq* polimeraze (ThermoScientific, Litvanija), a reakciona smeša se sastojala od komponente prikazanih u **Tabeli 7.**

Uslovi PCR reakcije su bili sledeći:

- 5 min 95 °C,
- 40 ciklusa: 15 s 95 °C, 30 s 55 °C, 30 s 72 °C i
- 10 min 72°C.

Tabela 7. Sastav reakcione smeše pojedinačne PCR reakcije

Komponente reakcione smeše za PCR reakciju	μl
voda	14,3
10 x <i>Taq</i> reakcioni pufer	2,5
dNTP (10 mM svaki)	0,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,0
specifični prajmeri mix (7,5 μM svaki)	3,3
<i>Taq</i> polimeraza (5 U/ μl)	0,4
cDNK iz prethodne reakcije	2,0
ukupno	25,00

Prajmeri su dizajnirani pomoću internet aplikacije Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Specifičnost svih korišćenih prajmera potvrđena je BLAST analizom, gel elektroforezom RT-PCR produkata (kao u odeljku 3.6.5. -PCR analiza) i analizom krive topljenja posle qPCR reakcije. Sekvence korišćenih prajmera prikazane su u **Tabeli 8**.

3.7.5. Pripremanje standarda za apsolutnu kvantifikaciju prečišćavanjem PCR produkata sa gela

Standardi za qPCR su pripremljeni prečišćavanjem razdvojenih PCR produkata sa gela nakon elektroforeze. Ekstrakcija je rađena sa Gene JET™ Gel Extraction Kit–om (ThermoScientific, Litvanija) prema uputstvu proizvođača. Trake na gelu, koje su se uočavale pri UV osvetljenju, odsecane su sterilnim skalpelom, a zatim ubacivane u sterilne ohlađene ependorf tube, u koje je potom dodat vezujući pufer (eng. *binding buffer*) u odnosu 1:1 (100 µl vezujućeg pufera : 100 mg agaroznog gela). Zatim je izvršena inkubacija u vodenom kupatilu na 56 °C do potpunog rastvaranja gela (oko 10 min). U uzorke je potom dodato 100 µl 100% izopropanola, vorteksovani su 5 s i naneti na kolone za prečišćavanje (eng. *purification column*). Nakon centrifugiranja na 13000 rpm u trajanju od 1 min, filtrat je odbačen, a kolone su vraćene u iste ependorf tube. Potom je dodato 700 µl pufera za ispiranje (eng. *wash buffer*), nakon čega je izvršeno centrifugiranje 1 min na 13000 rpm. Filtrati su bačeni, a kolone su vraćene u iste ependorf tube. Prazne kolone su centrifugirane 1 min na 13000 rpm da bi se u potpunosti odstranili ostaci pufera za ispiranje. PCR produkti su eluirani sa kolone dodatkom 50 µl elucionog pufera (eng. *elution buffer*) i centrifugiranjem na 13000 rpm u trajanju od 1 min. Koncentracija prečišćenih PCR produkata je određena spektrofotometrijski (odeljak 3.5.3).

Za svaki gen je napravljena serija razblaženja od 10^9 do 10^2 kopija po µl, koji su potom korišćeni kao standardi u qPCR analizama.

Tabela 8. Sekvence prajmera gena čija je ekspresija ispitivana u različitim tkivima *C. creticus*.

Gen	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'→3')	Dužina amplikona (bp)	Dužina prajmera (b)	GC (%)
<i>DXS</i>	<i>DXS</i> -F	GGTTTCGGCTCTCATGTATC	188	20	50,00
	<i>DXS</i> -R	TTTGGCCTTCCTAGAAAGTGA		20	45,00
<i>CLS</i>	<i>CLS</i> -F	GGTCTGTGGTAGAGACATCA	166	20	50,00
	<i>CLS</i> -R	TGGGTGAGACAACGTATCAT		20	45,00
<i>GGPPS1</i>	<i>GGPPS1</i> -F	ATCGAGAAAATCGAGGGAGTT	195	20	45,00
	<i>GGPPS1</i> -R	CTACTACAAACACGAAATCCGC		20	50,00
<i>GGPPS2</i>	<i>GGPPS2</i> -F	GGGAAAGAAGGGTTAGTAGC	176	20	50,00
	<i>GGPPS2</i> -R	AACCTCTCCACTTCCCTCATC		20	50,00
<i>DXR</i>	<i>DXR</i> -F	ACTGCTCCATCTCTTGATGA	166	20	45,00
	<i>DXR</i> -R	CACTGTTTCCACCCACAAA		19	47,37
<i>HMGR</i>	<i>HMGR</i> -F	TAAACTCCTCGCAACCATTTG	193	20	45,00
	<i>HMGR</i> -R	GGAGTTCGAGGGTCCATATT		20	50,00

3.7.6. Kvantitativni PCR (qPCR)

qPCR analiza je rađena pomoću Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mixa 2x (ThermoScientific, Litvanija) po uputstvima proizvođača. Sastav reakcione smeše je prikazan u **Tabeli 9**.

Tabela 9. Sastav reakcione smeše pojedinačne qPCR reakcije.

Komponente reakcione smeše	μl
Syber Green Mix	12,5
R+F prajmeri (po 0,3 μM)	1,0
voda	10,5
cDNK (100 ng/μl)	1,0
ukupno	25,0

SYBR Green I Master Mix predstavlja smešu *Taq* polimeraze, dNTP-ova, fluorescentno zelene boje SYBR Green I i referentne boje ROX u odgovarajućem puferu. Detekciju, a samim tim i analizu DNK obezbeđuje boja SYBR Green I, dok ROX boja, koja se zapravo ne vezuje za DNK i ima konstantnu fluorescenciju, omogućava normalizaciju varijacija između reakcija.

Sve qPCR reakcije urađene su u tri biološka ponavljanja u mašini ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, SAD). Uslovi amplifikacije su bili sledeći:

- 10 min 95 °C,
- 40 ciklusa: 15 s 95 °C, 30 s 55 °C, 30 s 72 °C i
- 10 min 72°C.

U cilju provere ujednačenosti količine ukupne cDNK u svim uzorcima paralelno sa amplifikacijom gena od interesa amplifikovan je i referentni gen za 18S rRNK. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju ovog gena prikazani su u **Tabeli 10**.

Tabela 10. Sekvence prajmera za gen *18S rRNK*

Gen	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'→3')	Dužina prajmera (b)	Dužina amplikona (bp)
<i>18S rRNK</i>	<i>18SB-F</i>	TGACGGAGAATTAGGGTTCG	20	190
	<i>18SB-R</i>	CAATGGATCCTCGTTAAGGG	20	

Ciklus u kome se dostiže prag (eng. *threshold cycle*, Ct) zavisi od početne koncentracije i razlikuje se između uzoraka (Simonović, 2011).

Za izračunavanje broja kopija transkripata (odnosno cDNK) u nepoznatom uzorku korišćene su standardne krive, koje pokazuju zavisnost Ct vrednosti od logaritamskog broja kopija matrice u standardnim razblaženjima na početku qPCR reakcije.

3.8. Ekstrakcija i imunodetekcija proteina

Biljni materijal iz eksperimenata dehidracije i rehidracije je u pravilnim vremenskim razmacima sakupljan, ispiran sa H₂O, zamrzavan u tečnom azotu i čuvan na – 80 °C do upotrebe.

3.8.1. Ekstrakcija proteina

Uzorci biljnog materijala su sprášeni u tečnom azotu, a zatim homogenizovani u izolacionom puferu (1:4 w/v) koji se sastojao od 100 mM kalijum fosfatnog pufera (pH 6,5) sa dodatkom 20µl/ml koktela inhibitora proteaza (Protease Inhibitor Coctail for Plant Tissue, Sigma-Aldrich, USA) i 10% (w/v) nerastvornog polivinilpolipirolidona (PVPP, Sigma-Aldrich, USA). Zatim su ovako homogenizovani uzorci centrifugirani na temperaturi od +4 °C, u trajanju od 20 min na 15000 g.. Koncentracija ukupnih proteina u supernatantu određivana je spektrofotometrijski na 595 nm (Bradford, 1976), pri čemu je kao proteinski standard korišćen BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*).

3.8.2. SDS-PAGE elektroforeza i imunodetekcija proteina

Priprema uzoraka je podrazumevala mešanje ekstrakata ukupnih proteina sa puferom za uzorke u odnosu 1:1 (v/v) (Laemmli, 1970). Pufer za uzorke se sastojao od 62 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% Na-dodecil sulfata (SDS), 10% glicerola, 2,5% BPB (eng. *bromophenol blue*) i 0,5% β -merkaptoetanol. Ovako pripremljeni uzorci zagreveni na 95 °C tokom 3 min, potom su brzo ohlađeni do 4 °C, a zatim centrifugirani 3 min na 12000 g.

Denaturišuća SDS-PAGE elektroforeza korišćena je za razdvajanje proteina uz upotrebu Mini-Protean Tetra Cell sistema (Bio-Rad, CA, USA). Proteini su razdvajani na 200 V tokom 120 min. U razdvajajućem gelu finalna koncentracija akrilamida iznosila je 10% (w/v), a u gelu za koncentrovanje 5% (w/v). Jednake zapremine uzoraka sa 10 μ g ukupnih proteina nanošene su na gelove, pri čemu su za određivanje molekulske mase proteina korišćeni obojeni markeri (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, ThermoScientific, Litvanija). Samo razdvajanje proteina je vršeno na dva gela. Jedan gel je korišćen za bojenje ukupnih proteina, tako što je gel inkubiran u rastvoru boje (eng. *Coomassie Blue*) na sobnoj temperaturi tokom 40 min, a zatim je obezbojavan u PDS rastvoru (eng. *Protein Destaining Solution*), koji se sastojao od ddH₂O, 15% metanola (v/v) i 7% glacijalne sirćetne kiseline (v/v). Drugi gel korišćen je za Immuno blotting analizu, pri čemu su proteini su sa poliakrilamidnog gela prenošeni na PVDF membranu (Bio-Rad, CA, SAD) putem elektrotransfera (Mini Trans-Blot Module, Biorad, CA, SAD). Uz korišćenje odgovarajućih antitela, po metodi Momčilović i Ristić (2007) ispitivano je prisustvo specifičnih proteina. Za imunodetekciju dehidrina korišćena su poliklonalna komercijalna primarna antitela (dehidrin, AS07 206, Agrisera Antibodies, Švedska) rastvorena u odnosu 1:1000 (v:v). U eksperimentima su upotrebljavana komercijalna sekundarna antitela (IgG-HRP, product No. A0545; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), koja su rastvorena u odnosu 1:20000 (v:v). Za detekciju antigenih proteina korišćena je metoda pojačane hemiluminiscencije (ECL, eng. *Enhanced Chemiluminescence*). Nivo ekspresije dehidrina utvrđen je korišćenjem ImageQuant software (Molecular Dynamics, CA, SAD).

3.9. Fitohemijske analize

3.9.1. Analiza isparljivih jedinjenja u kulturi *in vitro* *C. creticus*

3.9.1.1. GC-MS analiza (gasna hromatografija sa masenom spektrometijom) analiza korišćenjem *headspace* tehnike

Biljke *C. creticus* gajene u kulturi *in vitro* su usitnjene, prenete u staklenu bočicu sa gumenim septumima i nalivene sa H₂O do polovine ukupne zapremine. Uzorci su termostatorani 60 minuta na 80 °C, a zatim je pomoću hermetičkog šprica za *headspace* manuelno uzimanje uzorka (Agilent technologies, Australija) uzeto 0,5 ml iz parne faze i injektirano u aparat Hewlett-Packard HP-G1800C Series II GCD analitičkog sistema. Korišćena je HP-5MS kolona (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), noseći gas je bio helijum, a temperatura transfer linije iznosila je 260 °C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu m/z 40-400. Identifikacija pojedinačnih komponenata 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, 2007). Radi lakše interpretacije dobijenih rezultata uveden je i koncentracioni indeks (CI), parametar koji predstavlja merilo relativne zastupljenosti komponenata Koncentracioni parametar se izačunava tako što se najzastupljenijoj komponenti dodeli CI 1000, a onda se za ostale određuje prema formuli:

$$CI=1000 \times (\% \text{ m/m}) / (\% \text{ m/m najzastupljenije komponente})$$

Takođe je uveden i parametar RRT koji predstavlja relativno retenciono vreme (FID) odgovarajuće komponente u odnosu na odabranu referentnu (zajedničku) komponentu.

3.9.1.2. PTR-MS (eng. *Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry*) analiza

Detekcija isparljivih jedinjenja u atmosferi posuda za *in vitro* gajenje biljaka *C. creticus* urađena je na standardnom PTR-MS uređaju (Ionicon, Analytik, Innsbruck, Austria) na osnovu njihovih masa, a na osnovu jačine signala urađena je i relativna kvantifikacija. PTR-MS uređaj koji je korišćen omogućava detekciju isparljivih jedinjenja u veoma niskim koncentracijama (prag detekcije je 30 pptv = 30 x 10⁻¹² mol/mol), bez pripreme uzoraka i hromatografije. Uzimajući u obzir da su isparljiva jedinjenja jonizovana protonom iz H₃O⁺, maseni spektrometar detektuje molekulsku masu u pozitivnom modu [M+1]⁺.

Analiza koncentracije odabranih jedinjenja (m/z 135, m/z 137, m/z 153, m/z 205) u atmosferi posuda u kojima su gajeni različiti klonovi *Cistus creticus* izvršeno je tokom 20 ciklusa, na svakih 5 sekundi. Pritisak u reakcionoj komori je podešen na 2,04 mbar, a u detekcionoj komori na $4,3 \times 10^{-5}$ mbar. Zagrevanje inleta i drift cevi vršeno je na 60 °C, dok je odbrojavanje H_3O^+ jona bilo $5,5 \times 10^6$ cps.

3.9.2. Analiza etanolnih i dihlormetanskih ekstrakata *C. creticus* iz *in vitro* kulture

Kvalitativna i kvantitativna analiza uzoraka etanolnih ekstrakata izdanaka, korenova (transformisanih i netransformisanih) i transformisanih kalusa iz *in vitro* kulture *Cistus creticus* vršena je gasnohromatografski uz korišćenje dva tipa detektora.

3.9.2.1. Priprema uzoraka

Biljni materijal (izdanci, korenovi ili kalusi) je ispran tri puta sa ddH₂O, zamrznut i sprašen u tečnom azotu. Dodavan je 97% (v/v) etanol (Zorka, Šabac, Srbija) u odnosu 1:2 (w/v) za sveže uzorke ili 1:5 (w/v) za liofilizovane uzorke. Sonifikacija uzoraka je vršena na 35 kHz u trajanju od 10 minuta korišćenjem aparata Sonorex (tip RK-100, Sonorex Bandelin Electronic, Berlin, Nemačka). Ekstrakti su potom centrifugirani na 7000 g 10 minuta. Supernatanti su pre analize profiltrirani kroz 0,2 µm celulozne filtere (Agilent Technologies, Nemačka).

Eksudati kapitatnih trihoma su uz pomoć istanjenih vrhova pasterovih pipeta prikupljeni sa listova *C. creticus* gajenih *in vitro*. Radi lakše manipulacije korišćena je lupa (Carl Zeiss, Jena, Nemačka) sa uvećanjem 25x. Kapi eksudata su prikupljane sa listova dužine 1,5 do 2 cm i rastvarane u dihlormetanu (HPLC čistoće).

3.9.2.2. GC-MS i GC-FID analiza (gasna hromatografija sa masenom spektrometijom i gasna hromatografija sa plameno jonizujućim detektorom)

Kvalitativna i kvantitativna analiza uzoraka vršena je gasnohromatografski uz korišćenje dva tipa detektora. GC-FID analiza etanolnih ekstrakata urađena je na HP-5890 Series II gasnom hromatografu (Hewlett-Packard, SAD), koji je opremljen „*split-splitless*“ injektorom povezanim sa HP-5 kolonom (30 m x 0,32 mm, debljine filma 0,25 µm) i plameno jonizujući detektorom. U određenim slučajevima korišćen je Agilent Technologies gasni hromatograf model 7890 koji je takođe bio povezan sa HP-5

kolonom. Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 ml/min). Temperatura injektora iznosila je 250 °C, detektora 300 °C, dok je temperatura kolone rasla u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40-260 °C (4 °C/min), 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 (Hewlett-Packard, CA,USA), s tim što je korišćena HP-5MS kolona (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), a kao noseći gas helijum. Temperatura transfer linije iznosila je 260 °C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu m/z 40-450. U svim slučajevima etanolni 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, 2007). Procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC-FID) uzeti su kao osnova za kvantifikaciju podataka. Relativna kvantifikacija labdanskih diterpena određena je na osnovu GC-MS i GC-FID analiza uz korišćenje manuelne integracije pikova odabranih diterpena labdanskog tipa.

3.9.3. Određivanje ukupnog sadržaja fenola i flavonoida u etanolnim ekstraktima *C. creticus*

Za analizu su korišćeni etanolni ekstrakti dobijeni procedurom opisanom u odeljku 3.9.2.1. Ovi ekstrakti su zatim koncentrovani na 30 °C u vakuum uparivaču (Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg, Nemačka) do suve mase i rastvoreni u metanolu (HPLC čistoće) (2:1 w/v).

3.9.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje količine ukupnih fenola

Količina ukupnih slobodnih fenola u ekstraktima *Cistus creticus* je određena spektrofotometrijski korišćenjem Folin-Ciocalteu metode (Singleton i Rossi,1965) sa manjim modifikacijama. Količina od 50 µl uzorka je pomešana sa 475 µl 5% rastvora natrijum karbonata (Na₂CO₃) i 475 µl Folin-Ciocalteu reagensa (Sigma Aldrich, SAD).

Ovako pripremljena smeša je inkubirana 1 sat 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. Galna kiselina (Sigma Aldrich, Nemačka) korišćena je kao standard. Količina ukupnih slobodnih fenola izražena je u mM ekvivalenata galne kiseline (GAE) po miligramu suve mase ekstrakta (mM GAE / mg).

3.9.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje količine ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi u ekstraktima *Cistus* su određeni spektrofotometrijski, po metodi koju su opisali Karadeniz i sar., (2005), sa malim izmenama. Pomešano je 100 µl biljnog ekstrakta i 550 µl ddH₂O sa 40 µl 5% kalijum nitrita (KNO₂), nakon čega je smeša inkubirana 6 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je dodato 70 µl 10% AlCl₃ x 10 H₂O), a posle 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi dodato je 240 µl 1 M rastvora natrijum hidroksida (NaOH). Apsorbanca uzorka je očitavana na 510 nm, sa po tri ponavljanja. Rezultati su izraženi u mM ekvivalenata rutina (RE) po miligramu suve mase ekstrakta uzorka (mM RE/mg).

3.9.3.3. UHPLC / LTQ - OrbiTrap MS analiza (Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom sa hibridnim masenim spektrometrom LTQ Orbitrap XL)

Kvalitativna analiza uzoraka ekstrakta izdanaka, transformisanih i netransformisanih korenova je urađena korišćenjem UHPLC (Thermo Fisher Scientific, SAD) hromatografskog sistema u čijem sklopu se nalazi Acela 600 pumpa i Accela autosempler (ThermoFisher Scientific, Bremen, Nemačka) koji su povezani sa linearnom jonskom zamkom-Orbitrap hibridnim masenim spektrometrom (LTQ OrbiTrap XL, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka) sa elektron sprej jonizacijom (HESI-II, eng. heated electro spray ionization).

Hromatografsko razdvajanje je urađeno na Hypersil gold C18 koloni dimenzija 50 × 2,1 mm, sa česticama veličine 1,9 µm (Thermo Fisher Scientific, SAD). Mobilna faza se sastojala od (A) vode + 0,1% mravlje kiseline i (B) acetonitrila + 0,1% mravlje kiseline. Uzorci su eluirani prema sledećem gradijentu: 0-5 min 5% - 95% (B), 5-6 min

95% (B), a zatim 5% (B) u trajanju od 3 minuta. Protok je podešen na 0,4 ml/min, dok je injekciona zapremina bila 5 μ l. HESI parametri su iznosili: napon izvora 4kV; napon kapilare - 47V, napon jonskih sočiva 0V, temperatura kapilare 275 °C, protok gasa (N₂) u omotaču 25 AU (arbitrarne jedinice; eng. *arbitrary units*), protok aksilarnog gasa 8 AU. Podaci su praćeni u negativnom modu u opsegu akvizicije m/z od 100-900. Za ispitivanje fragmentacije, skeniranje je urađeno primenom koliziono-indukovane disocijacije molekula (CID, eng. *collision-induced dissociation*) pri čemu je energija kolizione ćelije podešena na 35 eV.

Za kontrolu instrumenta, kao i za prikupljanje i analizu podataka korišćen je Xcalibur softver (verzija 2.1). Mehanizam fragmentacije i karakterizacija fragmenata je potvrđena korišćenjem Mass Frontier softvera (verzija 6.0). Za identifikaciju jedinjenja korišćene su referentne internet baze i ChemSpider.

3. 10. Ispitivanje biološke aktivnosti etanolnih ekstrakta *C. creticus*

3.10.1. Priprema uzoraka

Etanolni ekstrakti *Cistus creticus* pripremljeni su na isti način kao i za potrebe hemijskih analiza opisanim u odeljku 3.9.2.1 (korišćen je svež biljni materijal). Etanolni uzorci su zatim koncentrovani na 30 °C u vakuum uparivaču (Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg, Nemačka) do suvog ostatka i čuvani na + 4 °C do dalje upotrebe.

3.10.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost je određivana DPPH metodom koju su opisali Brand-Williams i saradnici (1995). Metoda se zasniva na činjenici da se reakcijom antioksidansa stabilni DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali transformišu u 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazin. Zapravo, antioksidanti u reakciji sa DPPH radikalima vrše njihovu redukciju do žuto obojenog difenil-pikrilhidrazina, što dovodi do smanjenja apsorbance na 517 nm. Na osnovu nivoa obezbojenosti rastvora DPPH radikala može se odrediti potencijal antioksidativnih jedinjenja da redukuju DPPH. Pomešano je 500 μ l 200 μ M 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (Sigma Aldrich, Nemačka) rastvorenog u metanolu, 30 μ l uzorka i 470 μ l metanola. Ova smeša je inkubirana 30

minuta na sobnoj temperaturi, u mraku, da bi se odigrala reakcija redukcije DPPH radikala. Stepenn redukcije DPPH radikala je određen merenjem apsorbance na 517 nm, pri čemu su izvršena tri ponavljanja za svaki uzorak.

Antioksidativna aktivnost je predstavljena kao vrednost IC₅₀, koja predstavlja koncentraciju suvog ekstrakta koja je potrebna za neutralizaciju 50% DPPH radikala.

3.10.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Za *in vitro* ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata, korišćena je mikrodiluciona metoda, 96-sistem (Hänel i Raether, 1988; Espinel-Ingroff, 2001). Odabrano je 8 vrsta bakterija i 7 vrsta gljiva za testiranje.

3.10.3.1. Testirani organizmi

U eksperimentalnom radu korišćeni su mikroorganizmi deponovani u laboratoriji za Mikologiju, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd. Testirane su sledeće vrste Gram - negativnih bakterija: *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) i *Enterobacter cloacae* (klinički izolat), kao i sledeće vrste Gram -pozitivnih bakterija: *Bacillus cereus* (klinički izolat), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). U ispitivanjima antifungalne aktivnosti korišćene su sledeće gljive: *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *A. flavus* (ATCC 9643), *A. fumigatus* (ATCC 1022), *Fusarium verticillioides* (biljni izolat), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *P. ochrochloron* (ATCC 9112) i *Trichoderma viride* (IAM 5061). Kao pozitivna kontrola korišćeni su odgovarajući antibiotici i mikotici (1-3500 µg/ml), a 5% DMSO kao negativna kontrola (**Tabela 11**). Testovi su urađeni u duplikatu i ponovljeni tri puta.

Tabela 11. Antibiotici i mikotici korišćeni kao pozitivna kontrola u eksperimentima određivanja antimikrobne aktivnosti

Naziv	Proizvođač
Streptomicin	Sigma Aldrich, Nemačka (P7794)
Ampicilin	Panfarma, Beograd, Srbija
Bifonazol (Bicutrin)	Srbolek, Beograd, Srbija
Ketokonazol	Zorkafarma, Šabac, Srbija

3.10.3.2. Priprema kultura testiranih mikroorganizama

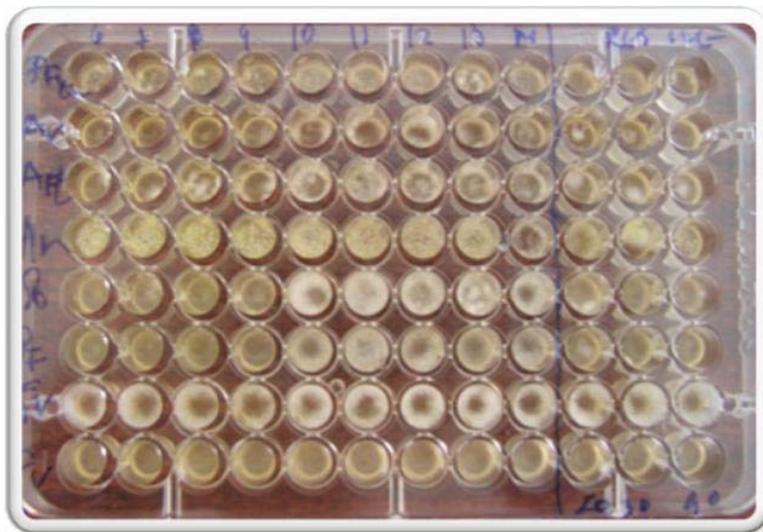
Bakterijski sojevi, čiji su stokovi čuvani u glicerolu, sterilnom špatulom su zasejani u 2 ml TSB hranljive podloge (Tryptic Soy Broth, Biolife, Italija), sa 30 g /l triptik soje, koje su pre upotrebe sterilisane u trajanju od 15 minuta na 121 °C. Ovako zasejane kulture u duplikatu, zajedno sa kontrolnim TSB epruvetama, su inkubirane na 37 °C tokom 24 h u termostatu. Iz prekonocnih kultura koje su sadržavale približno 1.0×10^9 ćelija po ml, preneto je po 100 µl u mikrotube sa po 900 µl hranjive podloge, pri čemu je dobijena koncentracija od 1.0×10^8 ćelija po ml. Željene koncentracije su dobijane daljim serijskim razređenjima, pri čemu je za mikrodilucionu metodu korišćena koncentracija 1×10^5 ćelija po ml.

Mikromicete su gajene u periodu od 21 dan na temperaturi od 26 °C na MA hranljivoj podlozi (Malt-Agar, Torlak, Srbija). Čuvane su na + 4 °C do trenutka upotrebe (Booth, 1971). MA hranljiva podloga je sadržala 15 g/l agara i 50 g/l ekstrakta slada i njena pH vrednost je podešavana na 7 pre sterilizacije autoklaviranjem, na 121 °C tokom 25 minuta. Priprema inokuluma je podrazumevala spiranje spora sa površine medijuma, u kulturama starosti 21 dan, uz korišćenje sterilnog 0,85% fiziološkog rastvora sa dodatkom 0,1% Tween 80 (v/v). Suspenzija spora je sterilnim fiziološkim rastvorom dovedena do konačne koncentracije od 1.0×10^5 ćelija u finalnoj zapremini od 100 µl. Pripremljen inokulum čuvan je na +4 °C do upotrebe. U cilju provere validnosti inokuluma, kao i odsustva kontaminacije, vršena je inokulacija na čvrstu MA podlogu.

3.10.3.3. Metoda mikrodilucije

U cilju određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC), minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC) i minimalnih fungicidnih koncentracija (MFC) serijski razređeni ekstrakti rastvoreni u 5% DMSO dodavani su u tečni medijum sa inokulumom

Mikroploče sa bakterijama i testiranim ekstraktima su inkubirane na 37 °C tokom 48 sati, dok su ploče sa inokuliranim gljivama i testiranim ekstraktima inkubirane 72 sata na 28 °C (**Slika 8**). Minimalna inhibitorna koncentracija je predstavljala najmanju koncentraciju na kojoj nije bilo vidljivog rasta mikroorganizama. U cilju potvrđivanja bakteristatične i baktericidne aktivnosti ekstrakata u mikrotitar ploče dodato je 40 µl boje p-jodonitrotetrazolijum violet (Sigma Aldrich, Nemačka) u koncentraciji 2 mg/ml H₂O. Zatim su mikrotitar ploče inkubirane tokom 2 sata na 37 °C. Mesta koja se nisu obojila predstavljala su rezultat baktericidnog dejstva, dok su mesta sa slabijom bojom u odnosu na ljubičastu boju kontrole ukazivala na bakteristatičko dejstvo. Rast mikrogljiva je praćen pod lupom (Carl Zeiss, Jena, Nemačka).



Slika 8. Određivanje antifungalne aktivnosti ekstrakata izdanaka i korenova iz *in vitro* kulture *C. creticus* mikrodilucionom metodom.

Minimalne baktericidne koncentracije (MBC) i minimalne fungicidne koncentracije (MFC) utvrđivane su reinokulisanjem po 2 µl u 100 µl svežeg tečnog medijuma i inkubacijom sledećih 24 sata na 37 °C (za bakterije) i 72 sata na 28 °C (za gljive). Vrednosti koncentracija ekstrakata koje ubijaju 99.5% bakterija/gljiva od početnog inokuluma, predstavljale su MBC ili MFC (CSLI, 2006, Tsukatani i sar., 2012).

3.10.4. Ispitivanje citotoksične aktivnosti

3.10.4.1. Čelijska kultura

Ćelije humanog karcinoma grlića materice (HeLa), dva tipa karcinoma dojke (MDA-MB-361 i MDA-MB-453), humanog karcinoma debelog creva (LS-174) i humanog melanoma (FemX) su održavane kao jednoslojne kulture na RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 hranljivom medijumu (Sigma Chemicals Co, SAD). RPMI 1640 hranljivi medijum je pripreman sa sterilnom dejonizovanom vodom, sa dodatkom penicilina (192 U/ml), streptomicina (200 µg/ml), 25 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid), 3 mM L-glutamina i 10% fetalnim goveđim serumom (pH 7,2). Ćelije su rasle na 37 °C u atmosferi zasićenoj vlagom i sa 5% CO₂.

3.10.4.2. Ispitivanje citotoksičnosti

Ispitivanje citotoksičnosti etanolnih ekstrakata izdanaka i korenova *C. creticus* iz *in vitro* kulture urađen je korišćenjem SRB (sulforodamin B – eng. *sulforhodamine B*) testa po proceduri opisanoj od strane Skehan i saradnika (1990). Ćelije HeLa (2000 c/w), MDA-MB-361 (7000 c/w), MDA-MB-453 (3000 c/w), LS-174 (7000 c/w) i FemX (3000 c/w) su pre testiranja rasle tokom 24 h na medijumu u plejtovima od 96 mesta (NUNC). Suvi ostatak biljnih ekstrakata je rastvoren u DMSO, filtriran kroz nepirogene sterilne filter promera 0,2 µm (Sarstedt, Nemačka) i dalje razblaživan u hranljivom medijumu do željene koncentracije (od 20 µg/ml do 100 µg/ml). Finalna koncentracija DMSO u medijumu nije nikada prelazila 1%. Rastvori različitih koncentracija ispitivanih ekstrakata su dodavani u bunariće, osim u kontrolne bunariće gde je dodavan samo hranljivi medijum. Svi testovi su rađeni tri pta. Hranljivi medijum sa rastvorom odgovarajuće koncentracije ali bez ispitivanih ćelija je korišćen kao blank

kontrola. Nakon inkubacionog perioda u trajanju od 72 h ćelije su fiksirane sa 10% v/v hladnom trihlorsirćetnom kiselinom na +4 °C u trajanju od 60 min. Nakon fiksacije trihlorsirćetna kiselina je odbačena, a bunarići su isprani destilovanom vodom i osušeni na vazduhu. SRB rastvor (0.4% w/v, u 1% sirćetnoj kiselini) je dodat u bunariće, nakon čega su ploče držane 30 min na sobnoj temperaturi. Ploče su potom isprane tri puta sa 1% sirćetnom kiselinom, osušene, a zatim je vezana boja rastvorena sa nepuferisanom 10 mM Tris bazom (tris-hydroxymethyl-aminomethane na pH 10,5. Apsorbanca je merena na ELISA čitaču (Thermo Labsystems Multiscan EX (200 - 240 V), Ascent Software Version 2.6) na talasnoj dužini od 570 nm. Koncentracija IC₅₀ je definisana kao koncentracija ekstrakta koja dovodi do 50% inhibicije ćelijskog preživljavanja. Cisplatina je korišćena za poređenje kao standardni citotoksični agens.

3.10.4.3 Morfološka analiza tretiranih ćelija

Morfološka analiza HeLa i MDA-MB-453 ćelija je praćena korišćenjem invertnog mikroskopa (Carl Zeiss, Jena, Nemačka) sa dodatkom digitalne kamere (Olimpus, SAD). Promene u ćelijskoj morfologiji odabranih ćelijskih linija beležene su nakon 72 h tretmana sa ekstraktima ili kontrolom (hranljivi medijum).

3.11. Statistička analiza podataka

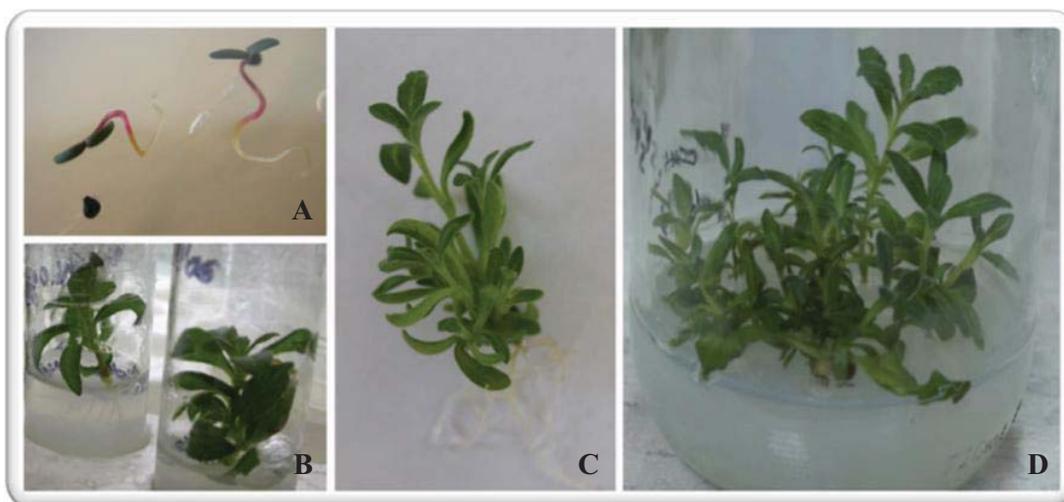
Statističke analize su urađene korišćenjem softvera STATGRAPHICS, Version 4.2 (STSC, Inc. and Statistical Graphics Corporation, Orem, UT). Numerički podaci su podvrgnuti analizi varijanse (*ANOVA*), a određivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti vršeno je Fisher's LSD (*least significant difference*) testom pri nivou značajnosti od $p \leq 0,05$. Različita slova koja prate numeričke vrednosti ukazuju na statistički značajne razlike. Tokom analize podataka ekspresije gena u eksperimentima dehidracije i rehidracije, kada su poređena dva skupa podataka, za kontrolu i tretman, značajnost razlika je utvrđena Studentovim t-testom sa nivoima značajnosti $p \leq 0,05$ (*) i $p \leq 0,01$ (**). Pre analize procentualnih podataka vrednosti su prvo normalizovane korišćenjem *arc-sin* transformacije.

4. REZULTATI

4.1. *In vitro* kultura *Cistus creticus* L.

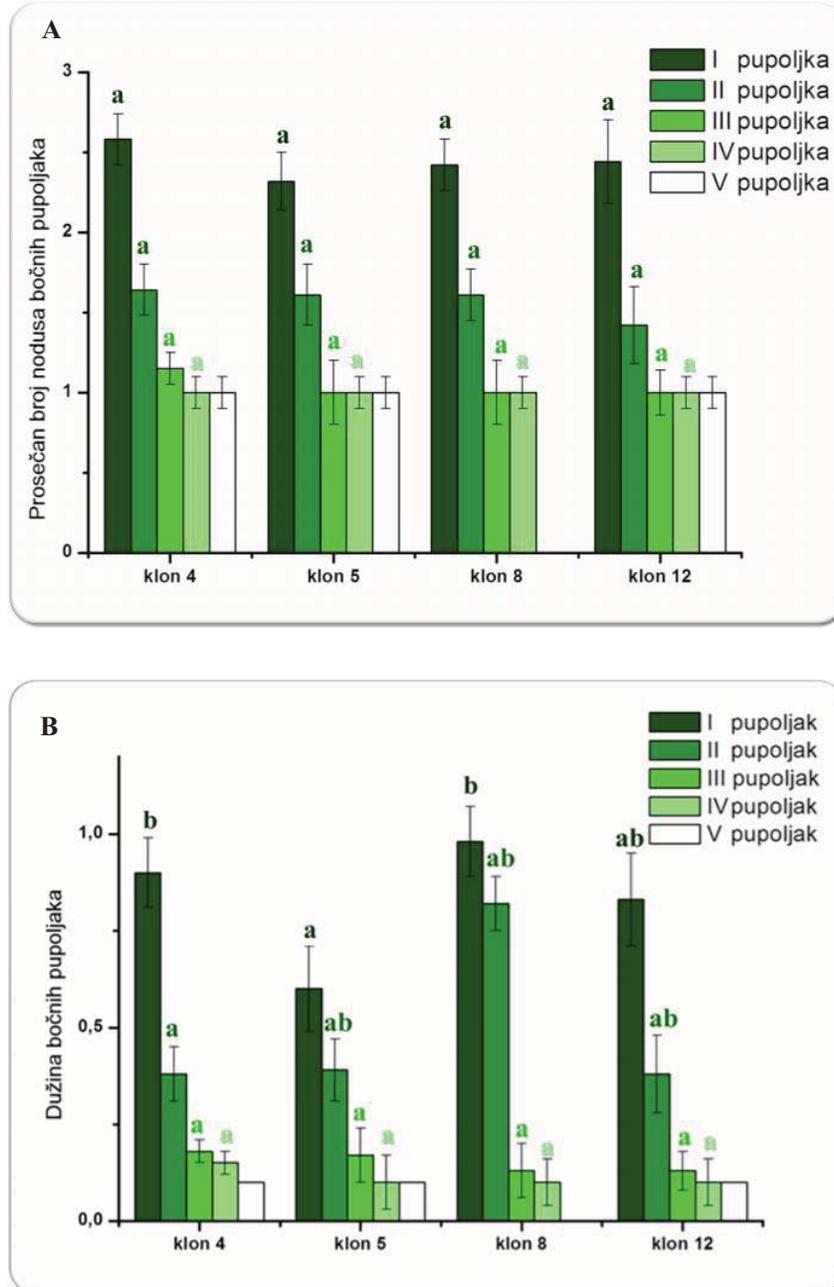
4.1.1. Morfološki parametri

Sterilisana semena *C. creticus* nakon tretmana povišenom temperaturom su klijala oko 95%. Klijanci su rasli na MS medijumu bez dodataka biljnih regulatora rasta (**Slika 9**). Za dalje umnožavanje nasumično odabrana 4 klona (oznake 4, 5, 8 i 12) korišćeni su segmenti stabla sa po jednim nodusom i vršni delovi izdanaka. Ovako dobijen materijal je korišćen u daljim eksperimentima početne mikropropagacije i hemijske analize.



Slika 9. *In vitro* kultura *Cistus creticus*. **A)** klijanci *C. creticus* na MS hranljivoj podlozi sa 30 g/l saharoze; **B)** izdanci; **C)** i **D)** dobro formirani i ožiljeni izdanci *C. creticus* na MS hranljivoj podlozi sa 30 g/l saharoze.

Formiranje aksilarnih pupoljaka u pazuhu listova eksplantata, kao i spontano ožiljavanje primećeno je na podlozi bez regulatora rasta (**Slika 9C**). Prosečan broj aksilarnih pupoljaka po eksplantatu je bio 2,5 (**Tabela 12**) Morfološki parametri četiri različita klona koji su beleženi 4 nedelje od postavke eksperimenta predstavljeni su u **Tabeli 12**, kao i na **Slici 10**.



Slika 10. Karakteristike rasta bočnih pupoljaka *C. creticus* u kulturi *in vitro* na MS hranljivoj podlozi sa 30 g/l saharoze: **A)** prosečan broj nodusa bočnih pupoljaka i **B)** dužina bočnih pupoljaka. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± standardna greška. Vrednosti označene istim slovima za svaku grupu (iste boje) ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

Tabela 12. Parametri rasta i razvića *C. creticus* u kulturi *in vitro* na MS hranljivoj podlozi sa 30 g/l saharoze. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± standardna greška. Vrednosti označene istim slovima u istoj koloni ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

Oznaka klon	Prosečan broj aksilarnih pupoljaka po eksplantatu	Ožiljavanje (%)	Prosečan broj korenova po eksplantatu	Dužina najdužeg korena (cm)
4	2,81 ± 0,26 a	60,76 ± 8,13 b	9,77 ± 1,55 a	1,37 ± 0,10 a
5	2,50 ± 0,32 a	23,76 ± 7,91 a	2,80 ± 3,25 a	1,88 ± 0,22 b
8	2,23 ± 0,26 a	73,54 ± 20,49 b	7,12 ± 1,46 a	1,74 ± 0,10 b
12	2,81 ± 0,33 a	72,46 ± 8,06 b	9,54 ± 2,02 a	1,65 ± 0,13 ab

Procenat ožiljavanja nakon 4 nedelje je iznosio oko 70% kod klonova 4, 8 i 12, dok je kod klona 5 bio značajno niži i iznosio je oko 30% (**Tabela 12**). Prosečan broj nodusa prvog bočnog pupoljaka je iznosio 2,5, dok je dužina prvog bočnog nodusa bila oko 1cm. Prosečan broj nodusa bočnih pupoljaka, kao i njihova dužina nije statistički značajno varirala između klonova (**Slika 10**).

4.2. Fitohemijske analize *C. creticus* gajenih *in vitro*

U cilju karakterizacije hemijskog profila *in vitro* kulture *C. creticus* urađene su hemijske analize isparljivih jedinjenja u atmosferi posuda gde su gajene ove kulture, kao i hemijske analize samih biljaka.

4.2.1. Analiza isparljivih jedinjenja u atmosferi *in vitro* kultura *C. creticus*

Gasnomasena analiza uz korišćenje *headspace* tehnike je pokazala da je α -pinen dominantno detektovano jedinjenje u parnoj fazi (**Slika 11**, **Tabela 13**), koji se na GC-MS hromatogramu uočava na $R_t = 6,86$ minuta.

Tabela 13. Detektovana jedinjenja u kulturi *in vitro* *C. creticus* analizom uz korišćenje *headspace* tehnike.

Br.	Jedinjenje	KIE	KIL	% m/m	RRT	CI
1	(3E)-2,3-Dimetil-1,3-heptadien	861,0	868	0,09	0,708	2
2	Triciklen	914,0	921	2,89	0,944	50
3	α -Pinen	926,7	932	57,84	1,000	1000
4	Kamfen	940,4	946	17,53	1,060	303
5	β -Pinen	969,2	974	11,52	1,188	199
6	Mircen	987,6	988	1,20	1,271	21
7	p-Menta-1(7),8-dien	999,0	1003	0,39	1,322	7
8	α -Terpinen	1012,2	1014	0,11	1,387	2
9	p-Cimen	1020,4	1020	0,08	1,428	1
10	Silvestren	1023,7	1025	2,00	1,445	35
11	γ -Terpinen	1054,5	1054	0,28	1,599	5
12	Terpinolen	1084,2	1086	0,16	1,747	3
13	cis-Limonen oksid	1127,7	1132	0,05	1,966	1
14	α -Kubeben	1345,3	1345	0,14	3,036	2
15	α -Kopaen	1371,0	1374	1,64	3,156	28
16	β -Kariofilen	1413,9	1417	0,21	3,355	4
17	γ -Elemen	1429,4	1434	0,08	3,424	1
18	4,5-di-epi-Aristolohen	1464,5	1471	2,22	3,581	38
19	Dauka-5,8-dien	1472,3	1471	0,08	3,614	1
20	α -Amorfen	1475,9	1475	0,03	3,632	1
21	β -Selinen	1480,9	1489	0,99	3,654	17
22	α -Selinen	1490,0	1498	0,24	3,696	4
23	δ -Kadinen	1519,3	1522	0,18	3,822	3
24	n.i.*	1693,9		0,03	4,545	0

KIE – eksperimentalno određen Kovačov indeks

KIL – Kovačov indeks iz literature

% m/m – procenat komponente u ekstraktu (masa na masu)

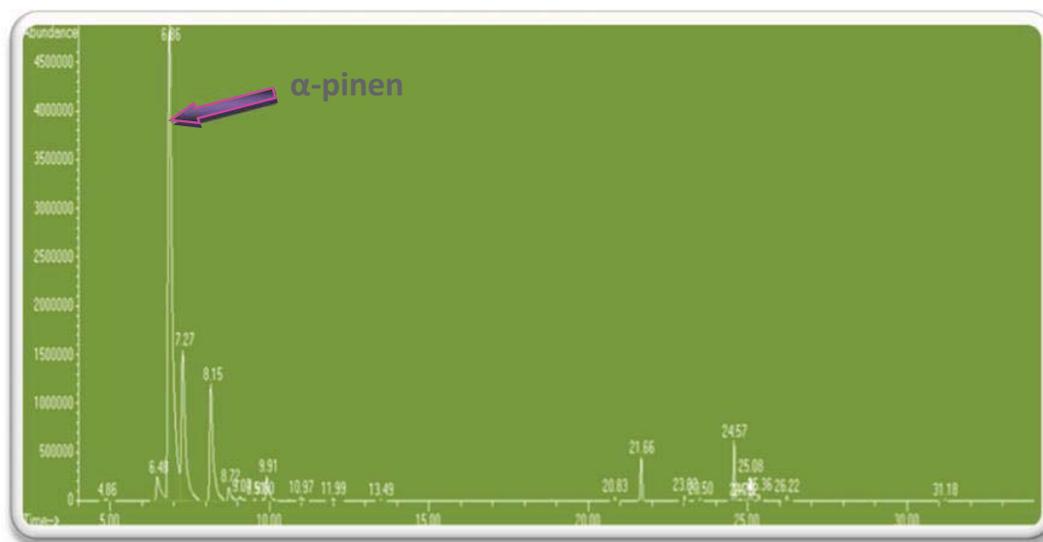
*n. i. – neidentifikovano jedinjenje

C.I. – koncentracioni indeks

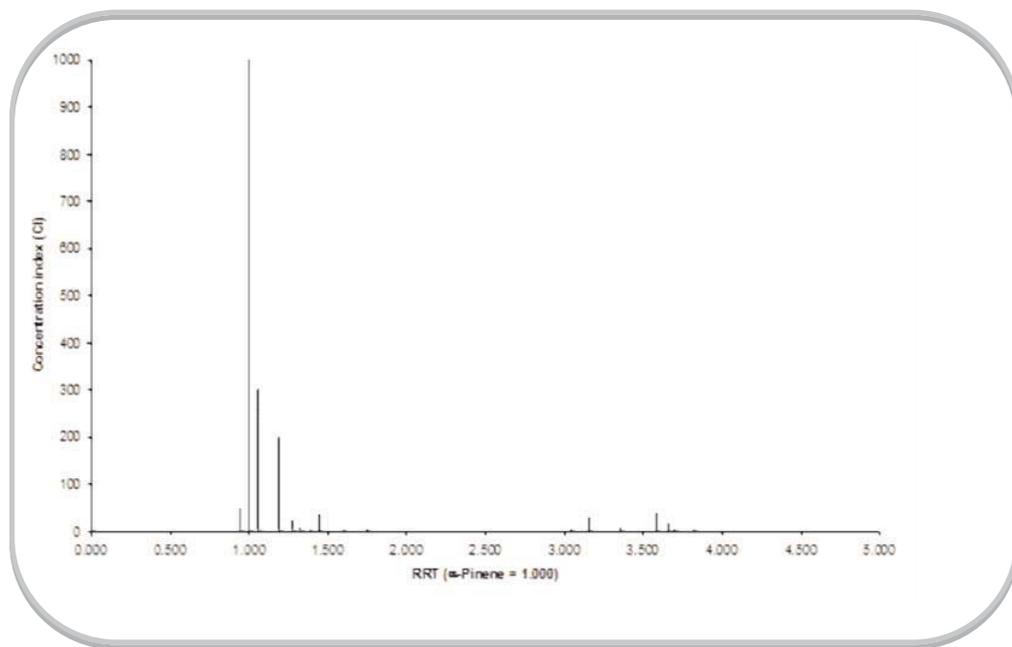
RRT - relativno retenciono vreme (FID) odgovarajuće komponente

Pored α -pinena, ovom analizom *in vitro* kulture *C. creticus* identifikovani su i drugi monoterpeni (kamfen, β -pinen, triciklen, silvestren, mircen, limonen (p-mentha-1,8-diene)), i seskviterpeni (α -kopaen, 4,5-di-epi-aristolohen, α i β -selinen, δ -kadinen, β -kariofilen) (Tabela 13, Slika 11 i 12). Diterpeni labdanskog tipa karakteristični za *C. creticus* nisu detektovani.

Rezultati su normalizovani u odnosu na najzastupljeniju komponentu i prikazani kao koncentracioni indeks (CI), radi lakše interpretacije. Prikazane su i vrednosti za parametar RRT koji predstavlja relativno retenciono vreme (FID) odgovarajuće komponente u odnosu na odabranu referentnu (zajedničku) komponentu. Uzimajući α -pinen kao najzastupljenije jedinjenje za referentnu komponentnu dobijen je normalizovan hromatogram (Slika 12), a vrednosti CI i RRT za sve komponente su prikazane u Tabeli 13.



Slika 11. GC-MS hromatogram dobijen analizom uz korišćenje *headspace* tehnike prilikom analiziranja *in vitro* kulture *C. creticus*. Strelicom je označen pik koji odgovara α -pinenu (Rt = 6,86)



Slika 12. Normalizovan GC-MS hromatogram koji je dobijen uz korišćenje *headspace* tehnike prilikom analize *in vitro* kulture *C. creticus*. Normalizacija je vršena u odnosu na α -pinen kao referentno jedinjenje.

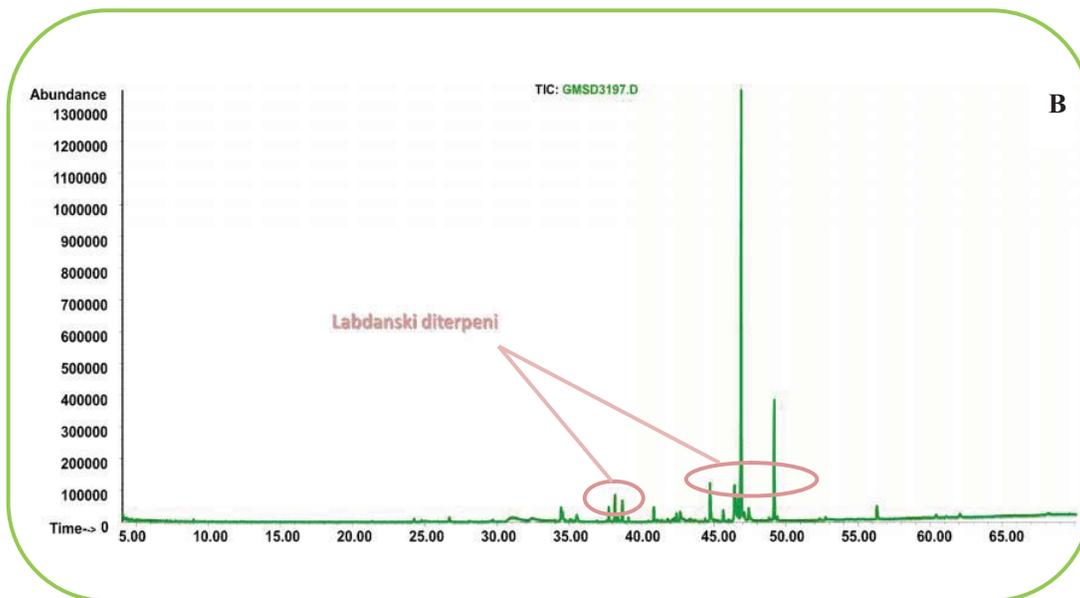
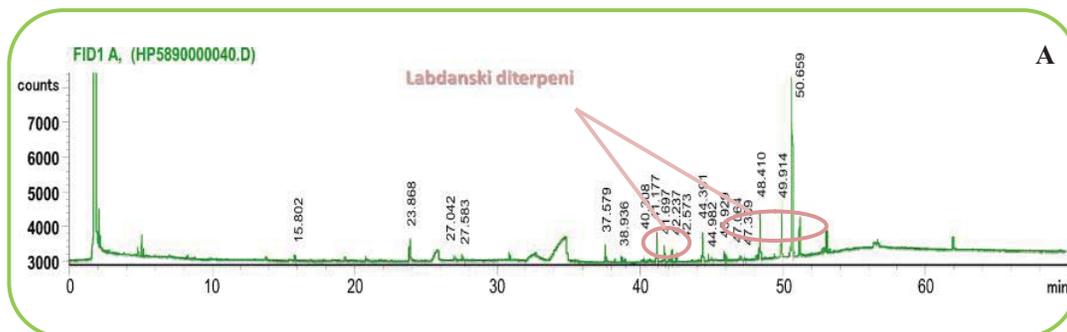
PTR-MS analizom je urađena relativna kvantifikacija monoterpena i seskviterpena u atmosferi posuda u kojoj su gajena četiri klona *C. creticus*. Praćena je koncentracija jedinjenja na protonovanoj masi m/z $[M+1]^+$ od 135, 137, 153 i 205, pri čemu nije bilo moguće njihovo pojedinačno razdvajanje. Izmerene vrednosti izražene su u ppbV i ukazuju na količinu odgovarajućih jedinjenja u bilionitom delu atmosfere. Monoterpeni su bili najzastupljeniji u atmosferi posuda za gajenje kod sva četiri klona *C. creticus* (Tabela 14).

Tabela 14. PTR-MS analiza sadržaja odabranih jedinjenja u atmosferi posuda za *in vitro* gajenje izdanaka *C. creticus* nakon 4 nedelje. Analiza je urađena na protonovanim masama m/z $[M+1]^+$ od 135, 137, 153 i 205. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja \pm standardna greška. Vrednosti u kolonama označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

Klon	m/z 135	m/z 137	m/z 153	m/z 205
	$C_{10}H_{14}$	$C_{10}H_{16}$	$C_{10}H_{16}O$	$C_{15}H_{24}$
	p-Cimen	Monoterpeni	cis-Limonen oksid	Seskviterpeni
4	9,19 \pm 0,56 a	458,38 \pm 51,69 a	2,23 \pm 0,34 a	10,90 \pm 0,56 ab
5	8,22 \pm 1,70 a	536,39 \pm 86,53 a	3,79 \pm 1,28 a	8,23 \pm 2,11 a
8	7,23 \pm 0,62 a	340,51 \pm 112,84 a	1,79 \pm 0,23 a	8,70 \pm 0,35 a
12	7,63 \pm 0,24 a	495,31 \pm 43,72 a	2,21 \pm 0,14 a	14,52 \pm 0,13 b

4.2.2. Analiza hemijskog sastava biljaka *C. creticus* gajenih u kulturi *in vitro*

Analiza hemijskog sastava biljaka gajenih *in vitro* je urađena nakon etanolne ekstrakcije. Kvalitativna i kvantitativna analiza uzoraka etanolnih ekstrakata 4 različita klona *C. creticus* iz *in vitro* kulture vršena je gasnohromatografski uz korišćenje dva tipa detektora: GC-MS i GC-FID. Rezultati hemijske analize etanolnih ekstrakata izdanaka starih 4 nedelje su prikazani u **Tabeli 15**. Identifikovane su dvadeset četiri komponente koje predstavljaju oko 65% isparljive frakcije etanolnih ekstrakata. Labdanski diterpeni su najdominantnije zastupljena jedinjenja, a među njima su najzastupljeniji labd-7,13-dien-15-ol i labd-7,13-dien-15-ol acetat sa oko 30% (**Slika 13, Tabela 15**). Labd-13E-8,15-diol je prisutan od oko 4% do 6,5%, dok je izomera manoil oksida detektovano oko 4%. Sklareol, sklareolid i sklareol-oksidi su prisutni u veoma malim količinama i ne prelaze 1%.



Slika 13. Gasnohromatografska analiza etanolnih ekstrakata *C. creticus*. A) GC-FID i B) GC-MS hromatogram etanolnog ekstrakta izdanaka iz *in vitro* kulture *C. creticus*. Pikovi koji odgovaraju diterpenima labdanskog tipa su zaokruženi na hromatogramima.

Tabela 15. Hemijski sastav etanolnog ekstrakta izdanaka iz *in vitro* kulture *C. creticus*– prikazane su identifikovane komponente u etanolnim ekstraktima izdanaka starih 4 nedelje. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± stand. greška. Vrednosti označene istim slovima u istom redu ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

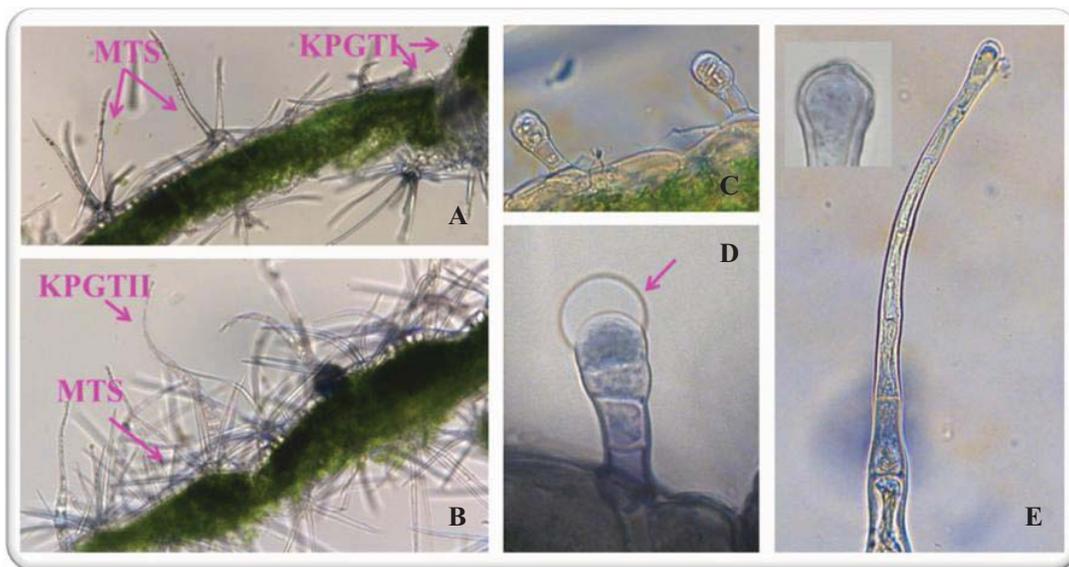
Jedinjenje	KIE	KIL	% m/m				
			klon 4	klon 5	klon 8	klon 12	
1 3,5-Dihidroksi-6-metil-2,3-dihidro-4H-piran-4-on	1152,4	1134	2,43 ± 0,18 b	1,15 ± 0,13 a	2,77 ± 0,33 b	3,12 ± 0,33 b	
2 α -Kopaen	1372,1	1374	7,74 ± 0,91 b	2,27 ± 0,78 a	8,38 ± 1,77 b	7,03 ± 1,92 b	
3 4,5-di-epi-Aristolohen	1465,5	1471	1,43 ± 0,13 b	0,42 ± 0,06 a	1,47 ± 0,13 b	1,23 ± 0,28 b	
4 β -Selinen	1482,1	1489	1,27 ± 0,22 a	1,07 ± 0,04 a	1,30 ± 0,08 a	0,88 ± 0,02 a	
5 Neofitadien (izomer II)	1835,8	1830	1,03 ± 0,11 a	0,70 ± 0,14 a	0,91 ± 0,17 a	1,00 ± 0,17 a	
6 Sklareoloksid	1876,5	1876	0,52 ± 0,02 a	0,41 ± 0,04 a	0,48 ± 0,03 a	0,79 ± 0,08 b	
7 Cembren	1932,8	1937	n.d.	0,21 ± 0,02 a	n.d.	0,16 ± 0,16 a	
8 (3Z)-Cembren A	1956,4	1965	2,52 ± 0,27 b	1,37 ± 0,13 a	2,10 ± 0,18 b	2,55 ± 0,14 b	
9 Labd-7,13,14-trien	1967,8	1978	1,93 ± 0,18 a	2,01 ± 0,13 a	2,10 ± 0,13 a	1,77 ± 0,23 a	
10 Manoil oksid	1986,0	1987	2,13 ± 0,41 b	1,44 ± 0,14 ab	1,82 ± 0,19 b	1,35 ± 0,14 a	
11 13-epi-Manoil oksid	2007,5	2009	1,15 ± 0,03 ab	1,50 ± 0,10 cb	1,01 ± 0,04 a	1,89 ± 0,34 c	
12 Labd-7,12(E),14-triene	2024,8	2036	0,50 ± 0,05 a	0,56 ± 0,05 a	0,57 ± 0,06 a	0,61 ± 0,03 a	
13 Sklareolide	2063,3	2065	0,76 ± 0,06 b	0,72 ± 0,05 b	0,73 ± 0,03 b	0,16 ± 0,02 a	
14 Labd-7,14-diene-13-ol	2082,6	2096	0,54 ± 0,07 a	0,43 ± 0,07 a	0,45 ± 0,08 a	0,52 ± 0,10 a	
15 Metil linoleat	2101,0	2095	0,87 ± 0,04 a	1,30 ± 0,08 b	0,79 ± 0,01 a	1,58 ± 0,30 b	
16 Fitol	2110,3	2114	2,66 ± 1,08 a	1,38 ± 0,72 a	1,44 ± 0,30 a	2,04 ± 0,30 a	
17 Inkensol acetat	2172,3	2184	0,46 ± 0,04 a	0,67 ± 0,05 b	0,47 ± 0,01 a	0,83 ± 0,09 b	
18 Sklareol	2217,9	2222	n.d.	0,43 ± 0,03 b	n.d.	0,23 ± 0,23 a	
19 Lariksol	2264,8	2265	n.d.	0,23 ± 0,03 b	n.d.	0,15 ± 0,02 a	
20 Labd-7,13-dien-15-ol	2282,2	2291	9,61 ± 0,94 a	13,79 ± 1,48 b	11,68 ± 1,03 ab	8,14 ± 1,00 a	
21 3- α -Acetoksi-manoil	2344,0	2359	0,69 ± 0,02 b	0,44 ± 0,05 a	0,86 ± 0,09 b	0,80 ± 0,17 b	
22 Labd-7,13-dien-15-ol acetat	2392,3	2392	16,38 ± 0,83 a	20,90 ± 1,80 b	17,98 ± 0,57 ab	16,60 ± 1,99 ab	
23 Labd-13(E)-8,15-diol	2412,5	2422	4,93 ± 0,47 a	6,08 ± 0,41 a	5,87 ± 0,60 a	4,47 ± 0,49 a	
24 Pentakozan	2496,4	2500	1,72 ± 0,15 a	1,50 ± 0,26 a	1,37 ± 0,23 a	1,82 ± 0,17 a	

KIE – eksperimentalno određen Kovačov indeks; KIL – Kovačov indeks iz literature; % m/m – procenat komponente u ekstraktu (masa na masu); n.d. – nije detektovano

4.3. Analiza trihoma biljaka *C. creticus* gajenih *in vitro*

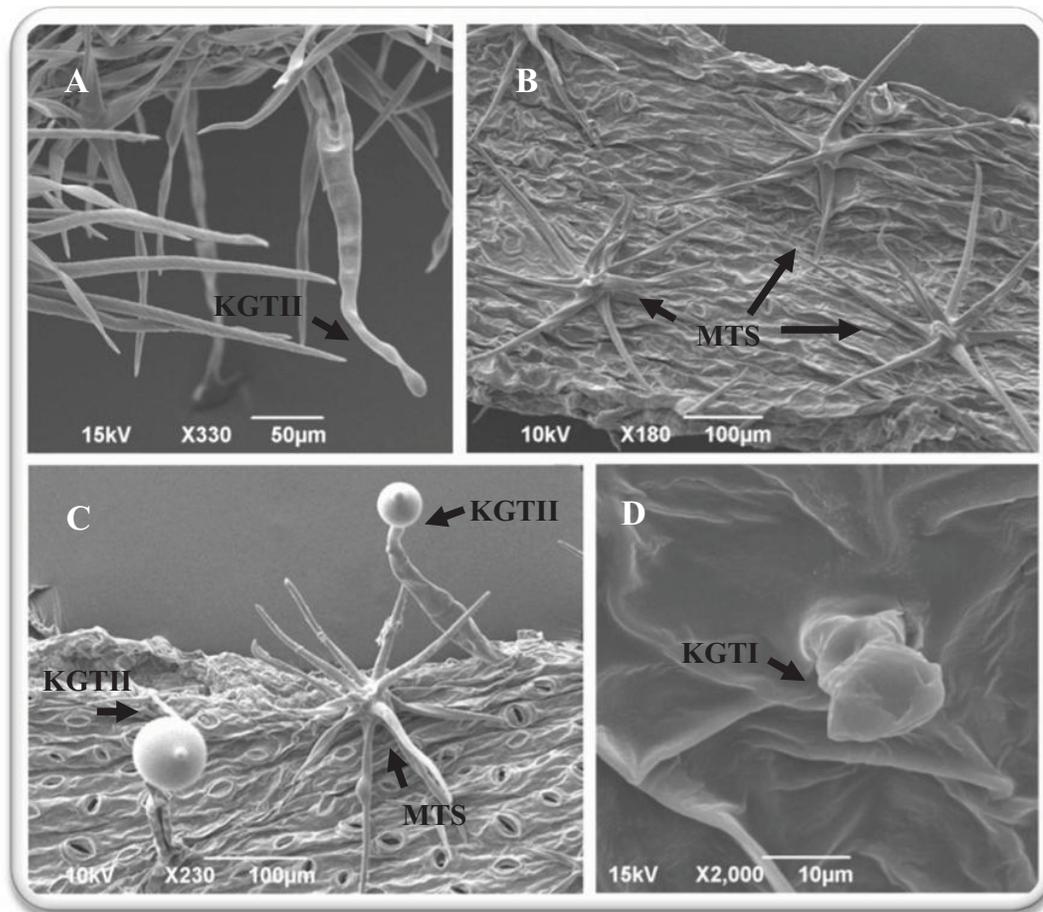
4.3.1. Morfološka analiza trihoma

Listovi *C. creticus* su gusto pokriveni mehaničkim i glandularnim trihomama sa obe strane lista. Mogu se jasno razlikovati višćelijske, stelatne trihome sa 6 do 12 krakova (**Slika 14A i 14B**). Glandularne trihome su kapitatnog tipa i mogu se na osnovu morfologije i tipa sekrecije podeliti na dva tipa. Glandularne trihome tipa I se sastoje od male sekretorne glavice i kratke drške koja se sastoji od bazalne ćelije, jednoćelijske drške i dve ili tri ćelije na vrhu (**Slika 14A, 14C**). Ovaj tip žlezdanih dlaka je pokriven kutikulom (**Slika 14D**). Tip II se sastoji od bazalne ćelije, višćelijske drške sa cilindričnim ćelijama u osnovi, a sa izduženim ćelijama u apikalnom regionu. Ovaj tip se završava sa malom, sferičnom jednoćelijskom sekretornom glavicom koja je pokrivena debelom kutikulom (**Slika 14E**). Uočljivo je i da indumentum lica i naličja lista izdanaka *Cistus creticus*, koji su rasli u uslovima *in vitro*, sačinjava veliki broj glandularnih i mehaničkih trihoma (**Slika 14B**).



Slika 14. Svetlosna mikrografija listova izdanaka iz *in vitro* kulture *C. creticus* **A**) i **B**) mehaničke trihome stelatnog tipa i kapitatne glandularne trihome **C**) kapitatne glandularne trihome tipa I **D**) kapitatna glandularna trihoma tipa I sa jasno izraženom kutikulom **E**) kapitatna glandularna trihoma tipa II sa multicelularnom drškom i sferičnom glandularnom glavicom. Skraćenice: KPGTI- kapitatne glandularne trihome tipa I; KGTII- kapitatne glandularne trihome tipa II; MTS- mehaničke trihome stelatnog tipa.

Na semi-elektronskoj mikrografiji *C. creticus* uočene su kapitatne glandularne trihome sa dugom i kratkom drškom, kao i neglandularne trihome stelatnog tipa (Slika 15). Na vrhovima kapitatnih glandularnih trihoma tipa II uočljive su karakteristične sferične sekretorne glavice (Slika 15C).

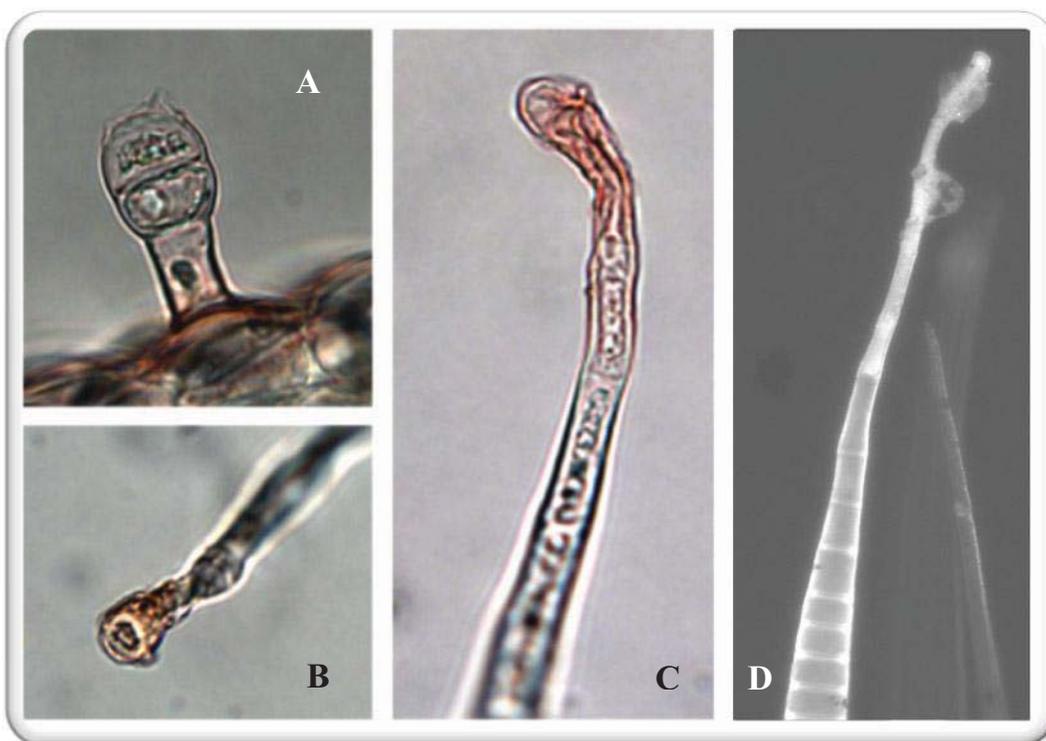


Slika 15. Elektronska mikrografija lista izdanaka iz *in vitro* kulture *C. creticus*. **A)** kapitatne glandularne trihome tipa II na adaksijalnoj strani lista **B)** mehaničke trihome stelatnog tipa **C)** kapitatne glandularne trihome tipa II i mehaničke trihome stelatnog tipa **D)** kapitatne glandularne trihome tipa I. Skraćenice: KPGTI- kapitatne glandularne trihome tipa I; KGTH- kapitatne glandularne trihome tipa II; MTS- mehaničke trihome stelatnog tipa.

4.3.2. Histoheмиjska analiza trihoma

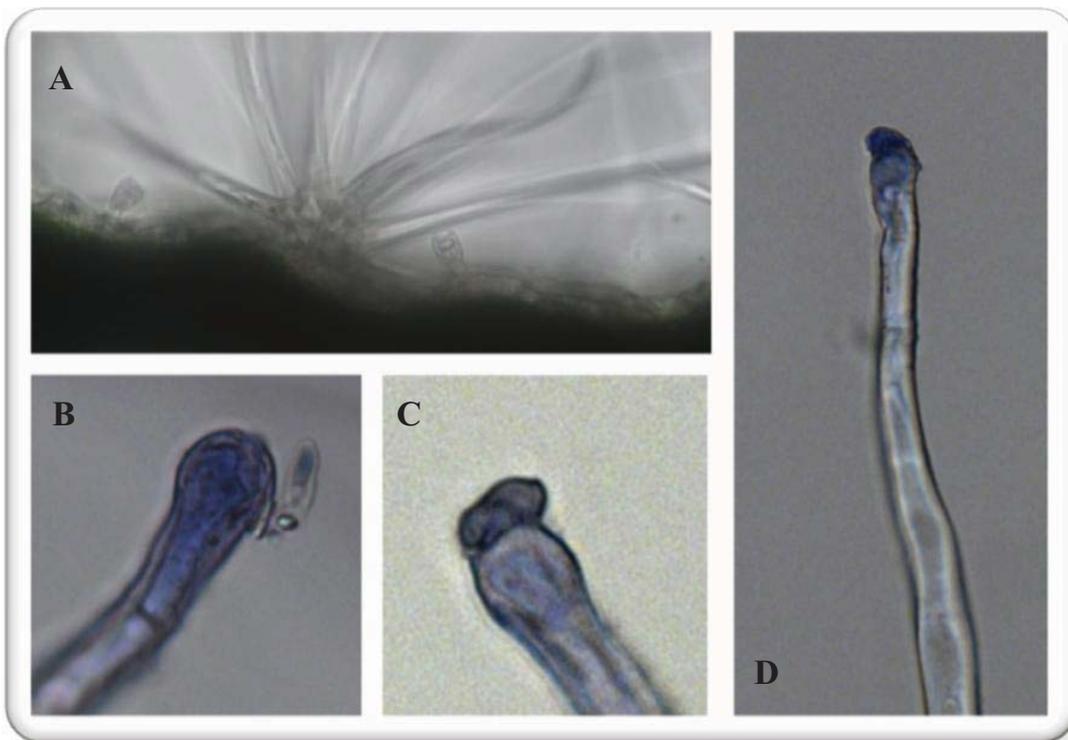
Glandularne trihome sa kratkom drškom (tip I) se nisu bojile sa Sudan IV u testovima za detekciju lipofilnog sekreta, kao ni mehaničke trihome. Kapitatne trihome

sa dugom drškom (tip II) su pokazivale pozitivnu reakciju prilikom bojenja sa Sudanom IV (Slika 16). Nadi reakcija je dovela do ljubičaste ili plavo-ljubičaste boje sekreta kod ovog tipa trihoma. Karakteristična boja se javljala u subkutikularnom prostoru kao i u glandularnoj ćeliji (Slika 17). Prisustvo fenolnih jedinjenja potvrđeno je plavom autofluorescencijom pod UV svetlom, pri čemu najsvetlije fluoresciraju bočni zidovi i sama glandularna glavica (Slika 16D). Rezultati ovih istraživanja pokazuju *in vivo* da tip II glandularnih trihoma kao sekretorni materijal sadrži terpene i fenolna jedinjenja.

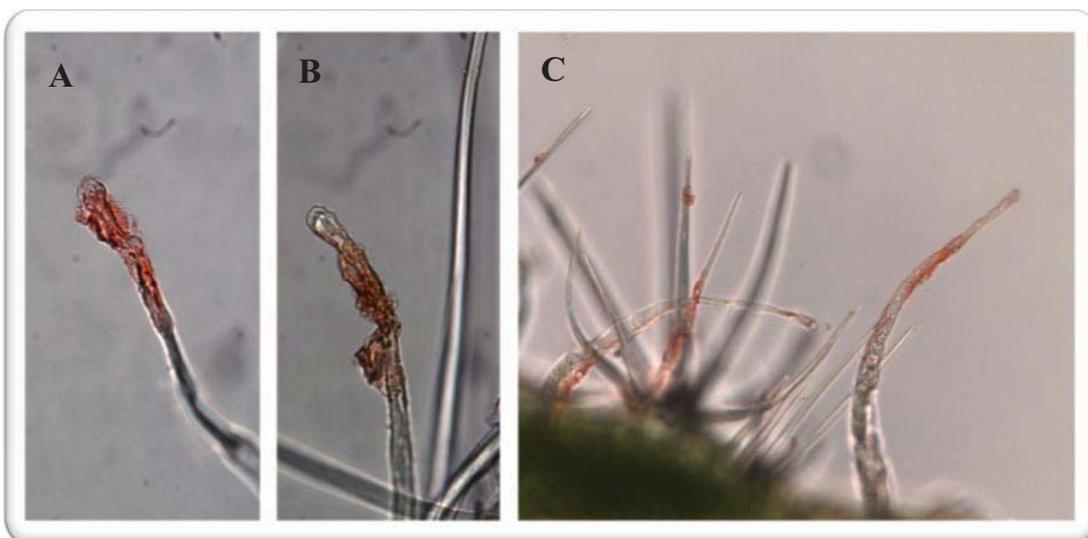


Slika 16. Histohemijska karakterizacija sekreta glandularnih trihoma *C. creticus* iz *in vitro* kulture. **A)** kapitatna glandularna trihoma tipa I bojena sa Sudanom IV; **B)** žuto obojena sekretorna glavica kapitatne glandularne trihome tipa II bojena sa Sudanom IV **C)** narandasto obojena kapitatna glandularna trihoma tipa II (Sudan IV); **D)** autofluorescencija pod UV svetlom kapitatane glandularne trihome tipa II

Prilikom histohemijskih analiza takođe je uočeno da kapitatne trihome sa dugom drškom produkuju značajne količine sekretornog materijala koji se izlučuje kroz sekretornu glavicu, preko spoljašnjeg dela drške, a zatim pada preko neglandularnih trihoma i površine lista (Slika 18).



Slika 17. Histohemijska karakterizacija terpena u trihomama *C. creticus* iz *in vitro* kulture – rezultati bojenja Nadi reakcijom. **A)** nebojene mehaničke stelatne trihome i kapitatne glandularne trihome tipa I; **B)** obojena glavica kapitatne glandularne trihome tipa II; **C)** obojenje subkutikularnog dela kapitatne glandularne trihome tipa II **D)** karakteristično obojena kapitatna glandularna trihoma tipa II



Slika 18. Sekretorni materijal KGTII se **A)** izlučuje kroz sekretornu glavicu, **B)** sliva se niz dugačku dršku i **C)** pada preko stelatnih trihoma i na površinu lista.

4.3.3. GC-MS i GC-FID analiza kapitatnih trihoma tipa II

Rezultati hemijske analize dihlormetanskih ekstrakata kapitatnih trihoma uzorkovanih sa listova biljka *C. creticus* gajenih *in vitro* prikazani su u **Tabeli 16**. Identifikovano je dvadeset komponenata koje predstavljaju oko 90% ukupno detektovanih jedinjenja. Labdanski diterpeni su najdominantnije zastupljena jedinjenja, a među njima su najzastupljeniji labd-7,13-dien-15-ol i labd-7,13-dien-15-ol acetat sa oko 50% (**Tabela 16**). Labd-13E-8,15-diol je prisutan od oko 0,6%, dok je izomera manoil oksida detektovano oko 14%. Labd-7,13,14-trien je prisutan sa oko 12%. Monoterpeni i seskviterpeni su detektovani u značajno manjoj količini u odnosu na labdanske diterpene.

Tabela 16. Hemijski sastav dihlormetanskog ekstrakta kapitatnih trihoma tipa II uzorkovanih sa listova izdanaka iz *in vitro* kulture *C. creticus*.

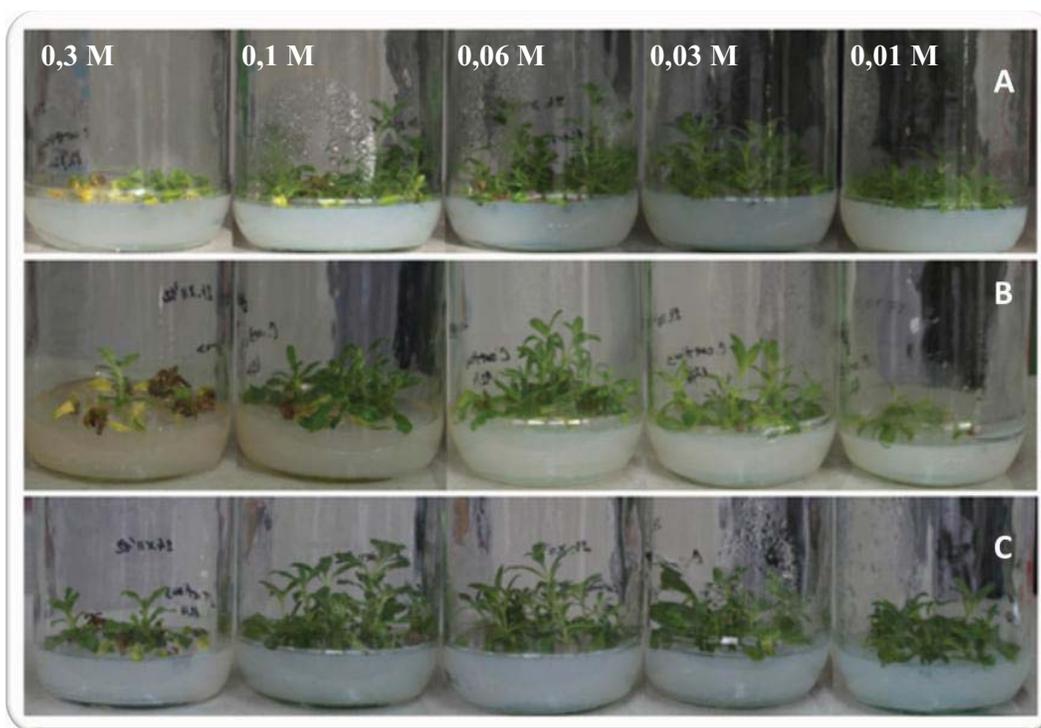
	Jedinjenje	Rt	%
1	α -Tujen	5,423	0,29 \pm 0,29
2	α -Pinen	5,840	1,17 \pm 0,61
3	Kamfen	6,252	0,28 \pm 0,14
4	β -Pinen	7,052	0,26 \pm 0,10
5	α -Kopaen	23,325	0,32 \pm 0,00
6	α -Bergamoten	25,206	0,43 \pm 0,02
7	4,5-di-epi-Aristolohen	27,426	1,65 \pm 0,20
8	β -Selinen	28,128	0,73 \pm 0,09
9	α -Selinen	28,645	0,30 \pm 0,01
10	δ -Kadinen	29,642	0,38 \pm 0,00
11	Pogostol	34,978	0,40 \pm 0,13
12	Sklareoloksid	43,315	0,22 \pm 0,06
13	Cembren	45,204	0,32 \pm 0,05
14	Manoil oksid	47,006	5,61 \pm 0,50
15	13-epi-Manoil oksid	47,853	5,08 \pm 0,39
16	Tunbergol	50,683	3,12 \pm 0,13
17	Labd-7,13-dien-15-ol	56,062	4,34 \pm 1,54
18	3- α -acetoksi- β -Manoil	58,793	2,77 \pm 0,25
19	Labd-7,13-dien-15-ol, acetat	59,055	46,78 \pm 1,19
20	Labd-13E-8,15-diol	59,749	0,60 \pm 0,00

Rt – retenciono vreme

4.4. Efekat različitih vrsta ugljenih hidrata na rastenje i razviće biljaka *C. creticus* u kulturi *in vitro*

Ispitivan je efekat različitih koncentracija saharoze, glukoze i fruktoze na rastenje i razviće *C. creticus* u kulturi *in vitro*. Ovi šećeri su dodavani u podlogu u opsegu koncentracija od 0,01 M do 0,3 M, a nodusi sa po jednim parom listova su postavljani kao inicijalni eksplantati.

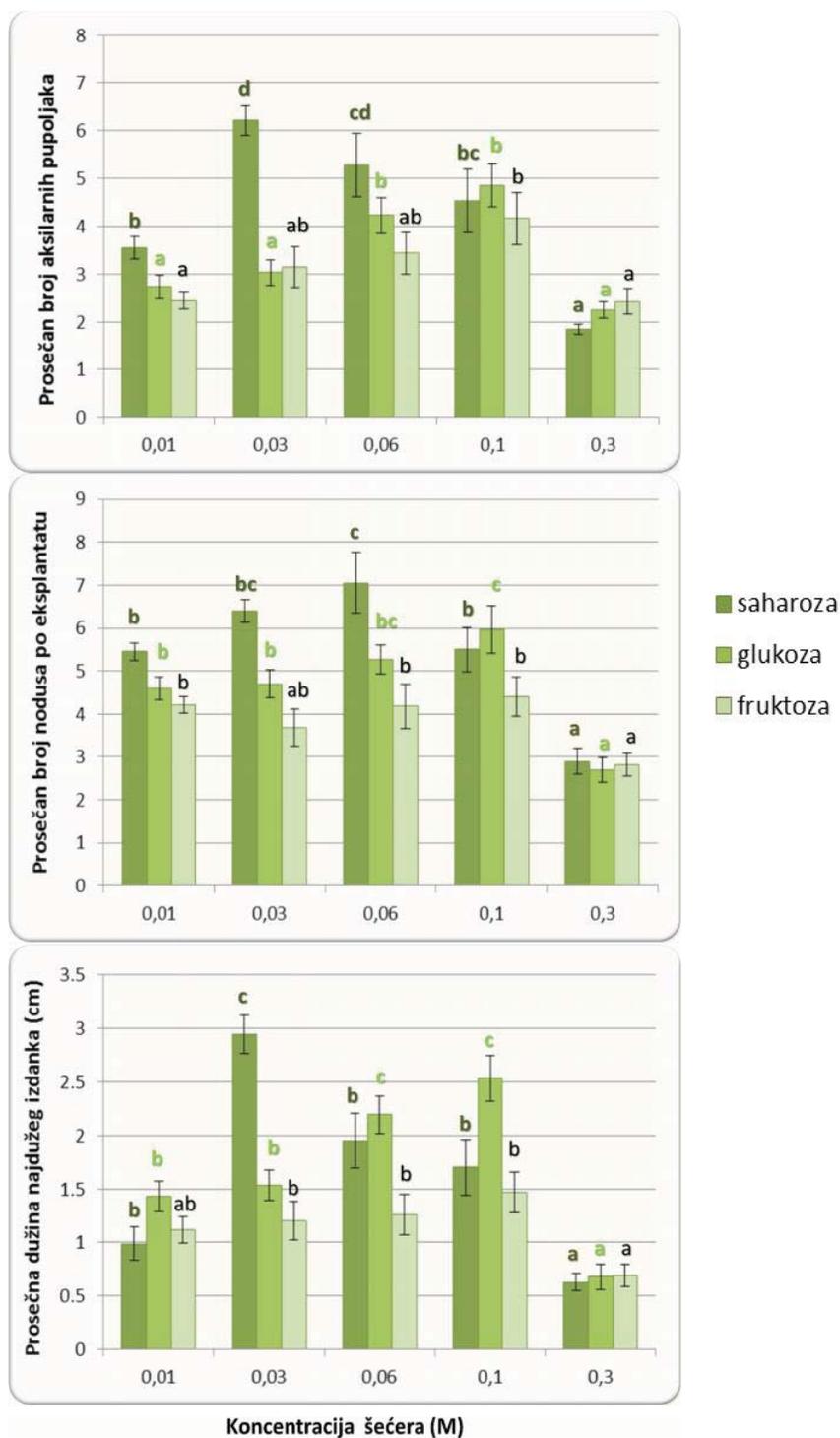
Najviša koncentracija šećera u podlozi od 0,3 M dovela je do nekroze tkiva, kao i do značajnog smanjenja broja formiranih aksilarnih pupoljka (**Slika 20**), što je posebno bilo izraženo pri dodavanju saharoze i fruktoze u medijum (**Slika 19**). Prosečan broj aksilarnih pupoljaka po eksplantatu je bio najviši na medijumu u koji je dodavana saharoza u opsegu od 0,03 M (prosečno 6,21) do 0,1 M (prosečno 4,53). Dodatak 0,1 M glukoze ili fruktoze u podlogu takođe je uslovio formiranje većeg broja aksilarnih pupoljaka - 4,5 do 5 pupoljka u proseku (**Slika 20**).



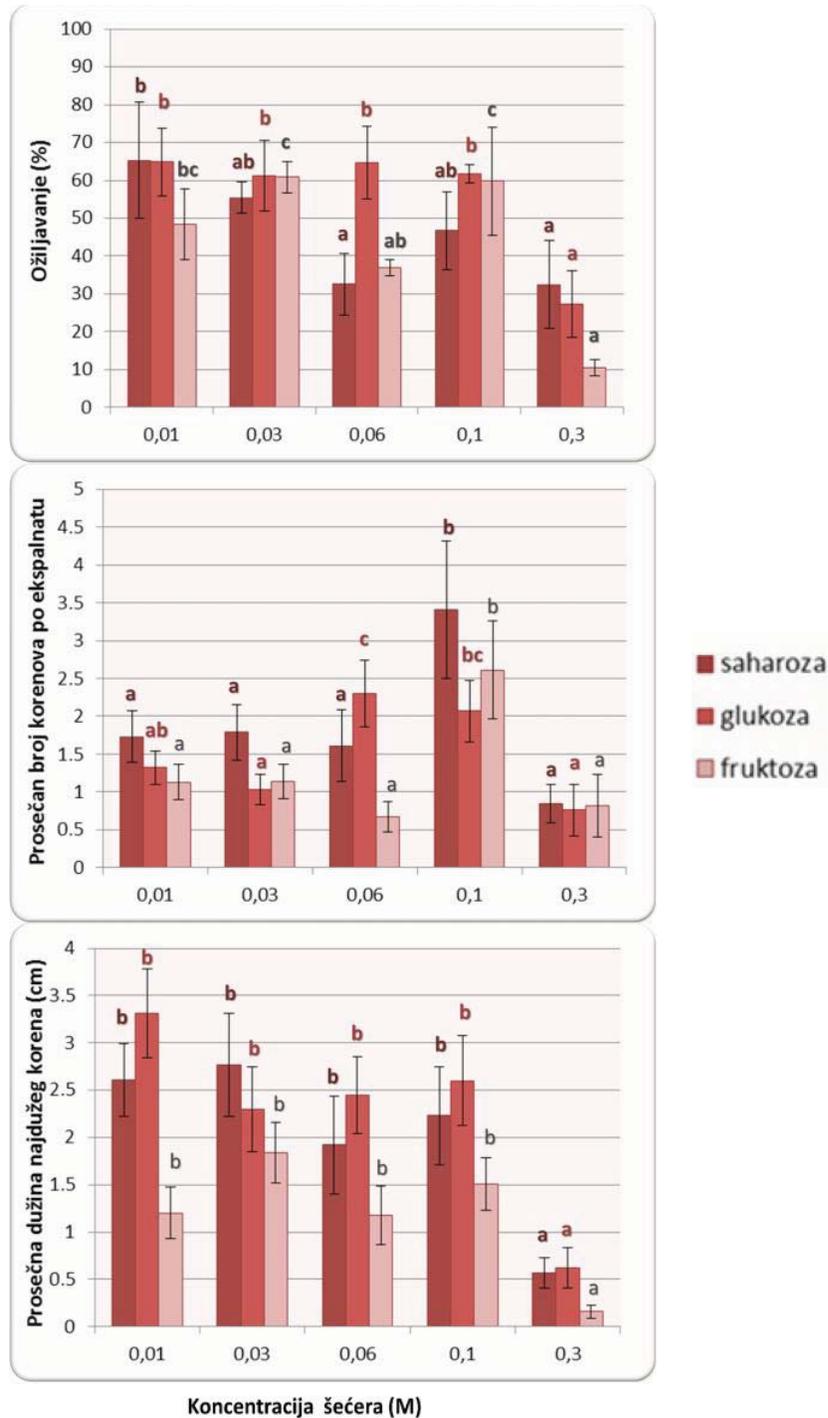
Slika 19. Efekat različitih koncentracija šećera na rastenje i razviće *C. creticus* u kulturi *in vitro*. Parametri su beleženi nakon 6 nedelja rasta na MS podlozi sa dodatkom A) saharoze, B) fruktoze i C) glukoze.

Rezultati parametara rastanja i razvića izdanaka *C. creticus* u kulturi *in vitro* pokazuju da je optimum koncentracija šećera od 0,03 M do 0,1 M (**Slika 19 i 20**). U okviru ovih koncentracija prosečan broj aksilarnih pupoljaka je bio i preko 6, prosečan broj nodusa po eksplantatu je iznosio preko 5, pri čemu je najduži izdanak imao dužinu oko 3 cm. Na najvišim primenjenim koncentracijama šećera (0,3 M) izdanci su dostizali najmanju dužinu (0,7 cm), a prosečan broj nodusa po eksplantatu je iznosio 3. Iako nešto bolji, parametri rasta na podlozi sa dodatkom 0,01 M šećera nisu bili zadovoljavajući. Uopšteno govoreći izdanci su dostizali najveću dužinu na podlozi sa dodatkom saharoze (u koncentracijama od 0,1 M do 0,03 M) i glukoze (u koncentracijama od 0,1 M i 0,06 M) (**Slika 19 i 20**).

Koncentracije šećera od 0,3M u hranljivoj podlozi dovodile su do ožiljavanja kod oko 30% eksplantata. Sa smanjenjem koncentracije svih šećera u hranljivoj podlozi broj ožiljenih izdanaka se povećavao (**Slika 21**). Procenat ožiljavanja je u proseku iznosio oko 70%, a u nekim slučajevima i oko 80%. Istovremeno na ovim podlogama su obrazovani i najduži korenovi (od 2 do 4 cm, **Slika 21**). Najveći broj korenova i to preko 3 korena po eksplantatu, formiran je na podlogama sa 0,1 M saharozom, odnosno fruktozom (**Slika 21**).



Slika 20. Parametri rastenja i razvicia *C. creticus* u kulturi *in vitro* na podlogama sa različitim koncentracijama šćera. Parametri su beleženi nakon 6 nedelja. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± standardna greška. Vrednosti označene istim slovima u okviru grupe (ista boja) ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.



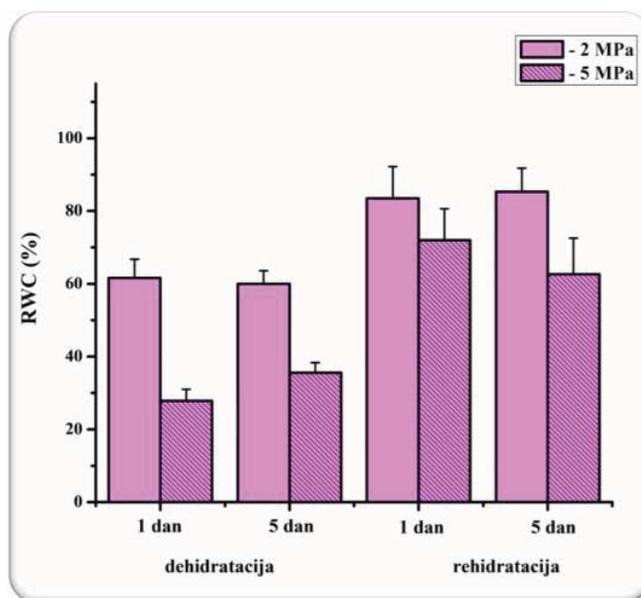
Slika 21. Parametri ožiljavanja *C. creticus* u kulturi *in vitro* na podlogama sa različitim koncentracijama šećera. Parametri su beleženi nakon 6 nedelja. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± standardna greška. Vrednosti označene istim slovima u okviru grupe (iste boje) ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

4.5. Uticaj dehidracije i rehidracije na kulture *C. creticus* gajene *in vitro*

Nodusi sa po jednim parom dobro razvijenih listova korišćeni su kao eksplantati za uspostavljanje *in vitro* sistema za praćenje procesa dehidracije i rehidracije. Morfološke i fiziološke promene su praćene i evidentirane tokom različitih faza dehidracije, kao i tokom oporavka od vodnog stresa.

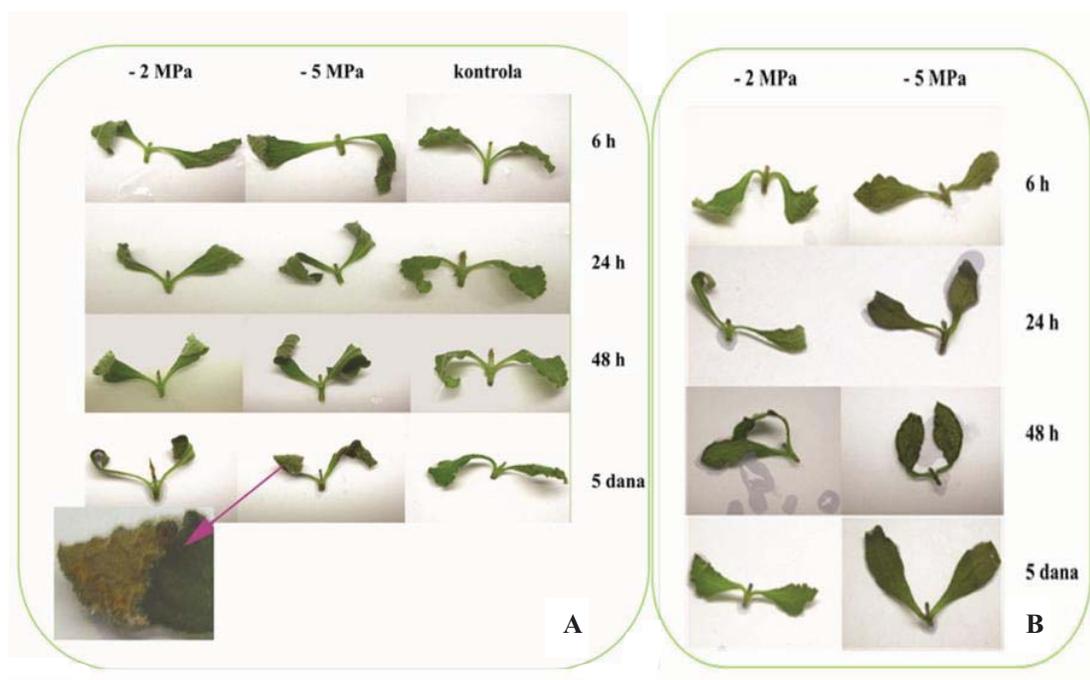
4.5.1. Promene u morfologiji i relativnom sadržaju vode u listovima *C. creticus* tokom ciklusa dehidracije/rehidracije

Promene u relativnom sadržaju vode (RWC) u listovima *C. creticus* su evidentirane u određenim vremenskim intervalima tokom 10 dana. Smanjenje relativnog sadržaja vode je uočeno već nakon jednog dana izlaganja vodnom deficitu: RWC u biljkama gajenim na -2 MPa je iznosio oko 60%, a u biljkama gajenim na -5 MPa je iznosio oko 30% (Slika 22). Produžena dehidracija u trajanju od 5 dana nije dovela do većeg smanjenja RWC (Slika 22). Jedan dan rehidracije dovodio je do potpunog oporavka RWC na oko 90% kod biljaka gajenih na -2 MPa, i delimičnog oporavka RWC kod onih koje su gajene na -5 MPa na oko 70% (Slika 22).



Slika 22. Promene u relativnom sadržaju vode u listovima *C. creticus* tokom procesa dehidracije i rehidracije. Tokom dehidracije biljke su gajene 1 ili 5 dana na podlozi sa sniženim vodnim potencijalom ($\psi = -2$ MPa i $\psi = -5$ MPa). Rezultati predstavljaju srednju vrednost dva nezavisna eksperimenta \pm standardna greška.

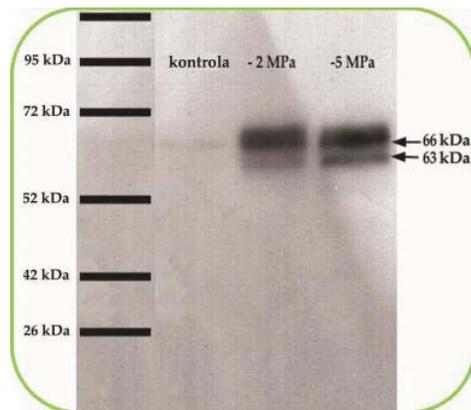
Tokom procesa dehidracije uočena je pojava uvenuća listova, kao i karakteristična uvijena forma (**Slika 23A**). Na listovima izdanaka koji su gajeni na -5 MPa zabeležena je pojava braon boje listova, naročito izražena nakon pet dana kontinuirane dehidracije (uvećan detalj na **Slici 23A**). Tokom procesa rehidracije uspostavlja se normalna forma listova izdanaka koji su gajeni na -2 MPa (**Slika 23B**), što je karakteristično za prolazno uvenuće. Ova pojava je zapažena u manjem obimu i kod listova izdanaka gajenih na -5 MPa, ali su oni u većini slučajeva zadržavali braon boju, a često su se uočavale i nekrotične promene (**Slika 23B**).



Slika 23. Promene u fenotipu izdanaka *C. creticus* tokom procesa dehidracije /rehidracije. **A)** Izgled izdanaka tokom dehidracije u trajanju od 5 dana; uvećan detalj pokazuje braon, nekrotično tkivo lista sa izdanka gajenog 5 dana na $\psi = -5$ MPa; **B)** Izgled izdanaka tokom procesa rehidracije (izdanci su nakon 5 dana dehidracije, prenešeni na medijum bez dodatka PEG i rehidracija je praćena tokom sledećih 5 dana)

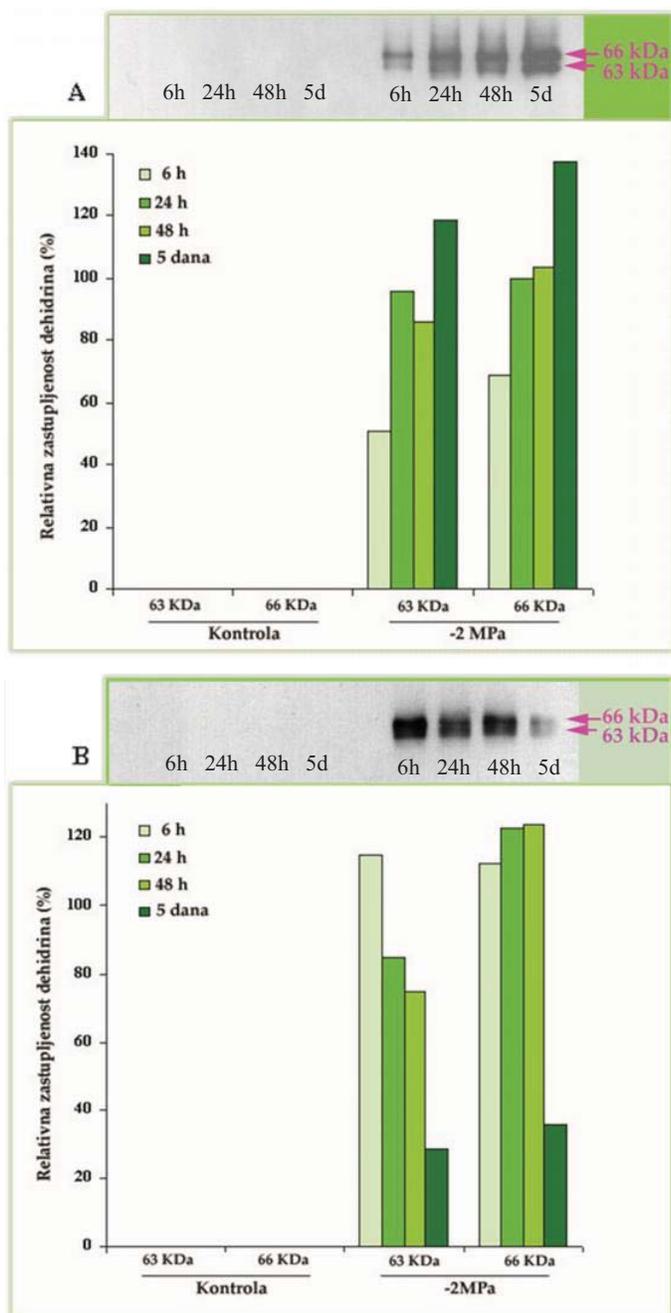
4.5.2. Promene u ekspresiji dehidrina na proteinskom nivou tokom ciklusa dehidratacije/rehidratacije

Dehidrini predstavljaju karakterističnu grupu proteina (familija LEA proteina) koji se ekspimiraju u biljkama izloženima vodnom stresu i dehidrataciji. Shodno tome proučavana je i promena ekspresije ovih proteina u listovima tretiranih izdanaka, kao potvrda postojanja stresa izazvanog dehidratacijom. Zastupljenost ovih proteina tokom ciklusa dehidratacije/rehidratacije u izdancima *C. creticus* je analizirana korišćenjem SDS-PAGE i imunoblot analize. Rezultati ukazuju na postojanje dve forme dehidrina, molekulske mase od 63 kDa i od 66 kDa (**Slika 24**), koje su se akumulirale tokom procesa dehidratacije u trajanju od 1 dana koje su jasno označene na početnom imunoblotu (**Slika 24**).



Slika 24. Akumulacija dehidrina nakon jednog dana u listovima izdanaka *C. creticus* gajenim *in vitro* na podlozi sa sniženim vodnim potencijalom ($\psi = -2$ MPa i $\psi = -5$ MPa).

Uzimajući u obzir činjenicu da je tretman od -5 MPa dovodio do naglog gubitka vode kao i do nekrotičnih promena u tkivima, za dalja ispitivanja korišćen je tretman od -2 MPa, pošto je vidljiva akumulacija dehidrina u listovima izdanaka uočena i u izdancima gajenim na ovom tretmanu. Dobijeni rezultati ukazuju na brzu i snažnu ekspresiju i akumulaciju ovih proteina tokom procesa dehidratacije (**Slika 25A**). Akumulacija je bila uočljiva već nakon 6 sati od početka dehidratacije, a najvišu relativna zastupljenost je detektovana nakon 5 dana (**Slika 25A**). Akumulacija dehidrina nije detektovana u kontrolnim izdancima. Visok nivo akumulacije dehidrina u izdancima *C. creticus* zadržao se tokom dva dana rehidratacije, a zatim je opao (**Slika 25B**).



Slika 25. Relativna zastupljenost dve izoforme dehidrina u listovima izdanaka *C. creticus* tokom procesa dehidracije (A) /rehidracije (B) u sistemu *in vitro*. Imunodetekcija proteina urađena je pomoću poliklonalnih anti dehidrin antitela. Gustina traka dobijenih nakon imunoblot analize kvantifikovana je densimetrijski i normalizovana u odnosu na odabranu vrednost (vrednost gustine trake izoforme od 66 kDa nakon 24h dehidracije). Stubići predstavljaju relativnu količinu izoformi dehidrina dobijenu u jednom od dva nezavisno sprovedena eksperimenta.

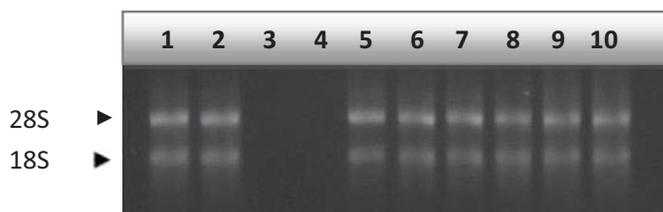
4.6. Produkcija labdanskih diterpena u izdancima *C. creticus* gajenih *in vitro*

Analiza produkcije labdanskih diterpena obuhvatala je analizu ekspresije odabranih gena koji učestvuju u biosintetskom putu terpena (uključujući i labdanske diterpene) u izdancima koji su izloženi različitim abiotičkim faktorima. Takođe, po završetku analize ekspresije odabranih gena u ovim izdancima je hemijskom analizom nakon etanolne ekstrakcije određen i ukupan sadržaj diterpena labdanskog tipa.

4.6.1. Ekspresija gena koji učestvuju u biosintezi terpena u izdancima *C. creticus*

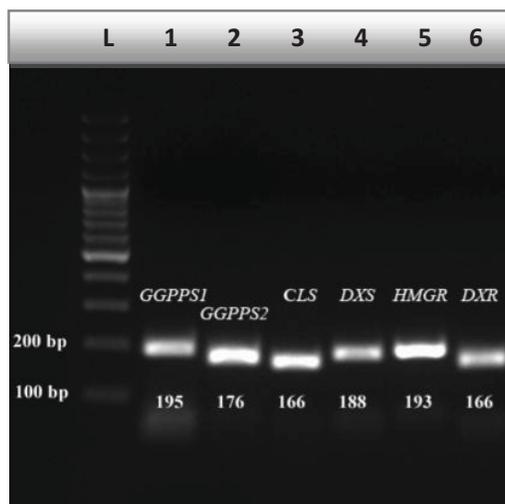
Ekspresija gena koji učestvuju u biosintezi terpenoida kod *C. creticus* praćena je promenom ekspresije *HMGR* gena iz MVA puta i pet gena iz MEP biosintetskog puta: *DXS*, *DXR*, *GGPPSI*, *GGPPS2* i *CLS*. MEP put je lokalizovan u plastidima i odgovoran za biosintezu labdanskih diterpena, pa je poseban akcentat stavljen na ispitivanje ekspresije gena koji učestvuju u njemu.

Iz biljnog materijala je najpre izolovana ukupna RNK. Kvalitet izolovanih RNK je proveren na agaroznom gelu. Utvrđeno je da su izolovane RNK bile zadovoljavajućeg kvaliteta i koncentracije. Jedino je RNK izolovana iz izdanaka gajenih na najvišim koncentracijama šećera (0,3 M) bila lošeg kvaliteta $A_{260}/A_{280} (< 1,7)$ i koncentracije ($< 0,35 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pri čemu se na gelu nije mogla ni vizuelizovati (**Slika 26**).



Slika 26. RNK izolovane iz izdanaka i korenova *Cistus creticus* vizuelizovane sa EtBr na 2% agaroznom gelu. Elektroforeza se odvijala na 100 V sa po 2 μg RNK u bunariću. RNK izolovana iz izdanaka gajenih na različitim podlogama i pri različitim tretmanima 1) 0,03M fruktoza; 2) 0,01M saharoza; 3) 0,3M saharoza; 4) 0,3M glukoza; 5) 0,06M saharoza; 6) 0,03 M glukoza; 7) nakon 1 h povrede; 8) nakon 3 h od povrede; 9) nakon 6 h od povrede; 10) kontrolna grupa za rehidraciju nakon 48 h.

Izolovana RNK je reverzno transkribovana i potom je amplifikovana prajmerima specifičnim za svih šest gena, pri čemu su dužine amplikona odgovarale očekivanim dužinama (**Slika 27**). Dobijeni amplikoni su prečišćeni agaroznom elektroforezom ekstrahovani su iz gela, spektrofotometrijski su kvantifikovani i napravljena je serija razblaženja od 10^9 do 10^2 kopija po μl , koji su potom korišćeni kao standardi za apsolutnu kvantifikaciju u qPCR analizi.

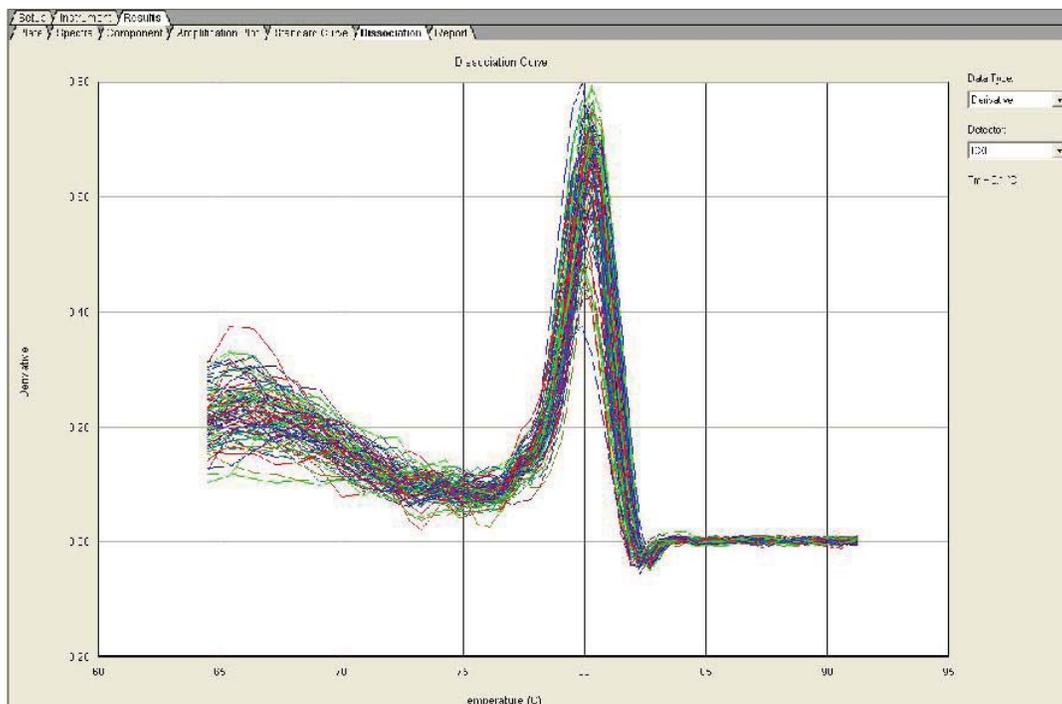


Slika 27. PCR produkti odabranih 6 gena koji učestvuju u biosintetskom putu labdanskih diterpena kod *C. creticus*; L – DNK marker, 1-6 amplikoni odgovarajućih gena sa odgovarajućim dužinama

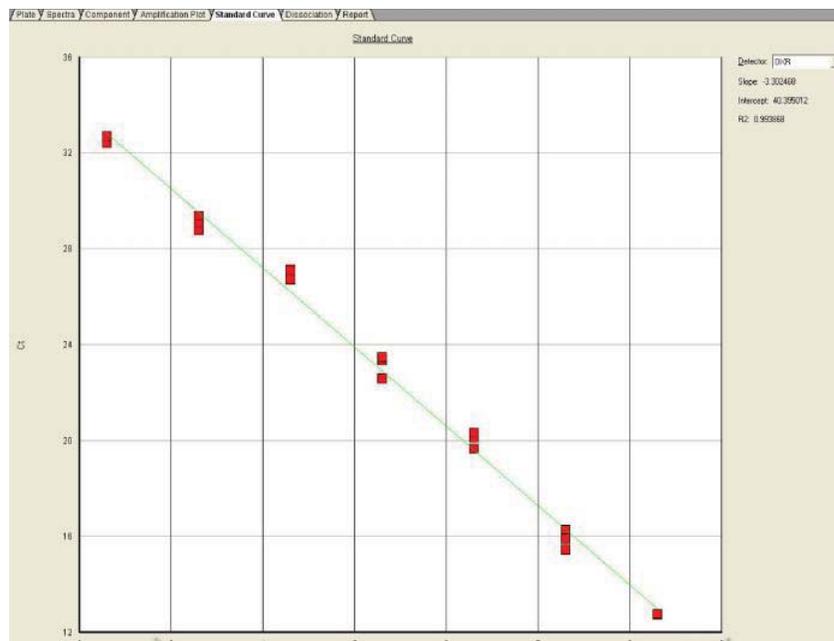
Specifičnost amplifikacije pet gena potvrđena je analizom temperatura topljenja (T_m) amplikona nakon qPCR eksperimenata, koja je kod svih analiziranih uzoraka imala jasan jedinstven maksimum u temperaturnom opsegu od $79\text{ }^\circ\text{C}$ - $80\text{ }^\circ\text{C}$ (**Slika 28**). Analiza temeperature topljenja za gen *GPPS2* pokazala je varirajući temperaturni opseg amplikona, pa su vrednosti za ovaj gen izostavljene iz dalje analize.

Standardne krive su bile oblika $y=ax+b$. Nagib krive (a) je dobar pokazatelj efikasnosti qPCR reakcije. Idealan nagib je oko $-3,3$, jer je tada efikasnost reakcije oko 100%, prema jednačini $E = 10^{(-1/a)} - 1$. Efikasnost qPCR reakcije za svih pet gena je bila u opsegu preporučenih vrednosti od 90% do 110%, tj. nagib krive je iznosio od $-3,1$ do $-3,6$ (**Slika 29**). Vrednost R^2 za standardne krive je iznosila preko 0,985 (**Slika 29**).

Ujednačena količina ukupne cDNK svih uzoraka potvrđena je paralelnom amplifikacijom referentnog gena za *18S rRNK*. Prosečan broj ciklusa posle kojih se dostizao prag detekcije (Ct) referentnog gena za *18S rRNK* bio je ujednačen, što je potvrdilo i odsustvo statistički značajne razlike posmatranih uzoraka (rezultati nisu prikazani).



Slika 28. Zbirne krive topljenja produkata qPCR amplifikacije cDNK izdanaka i korenova *C. creticus* gajenih *in vitro*, pomoću prajmera specifičnih za *DXR*. Ujednačen oblik krive i položaj maksimuma potvrđuju specifičnost amplifikacije.



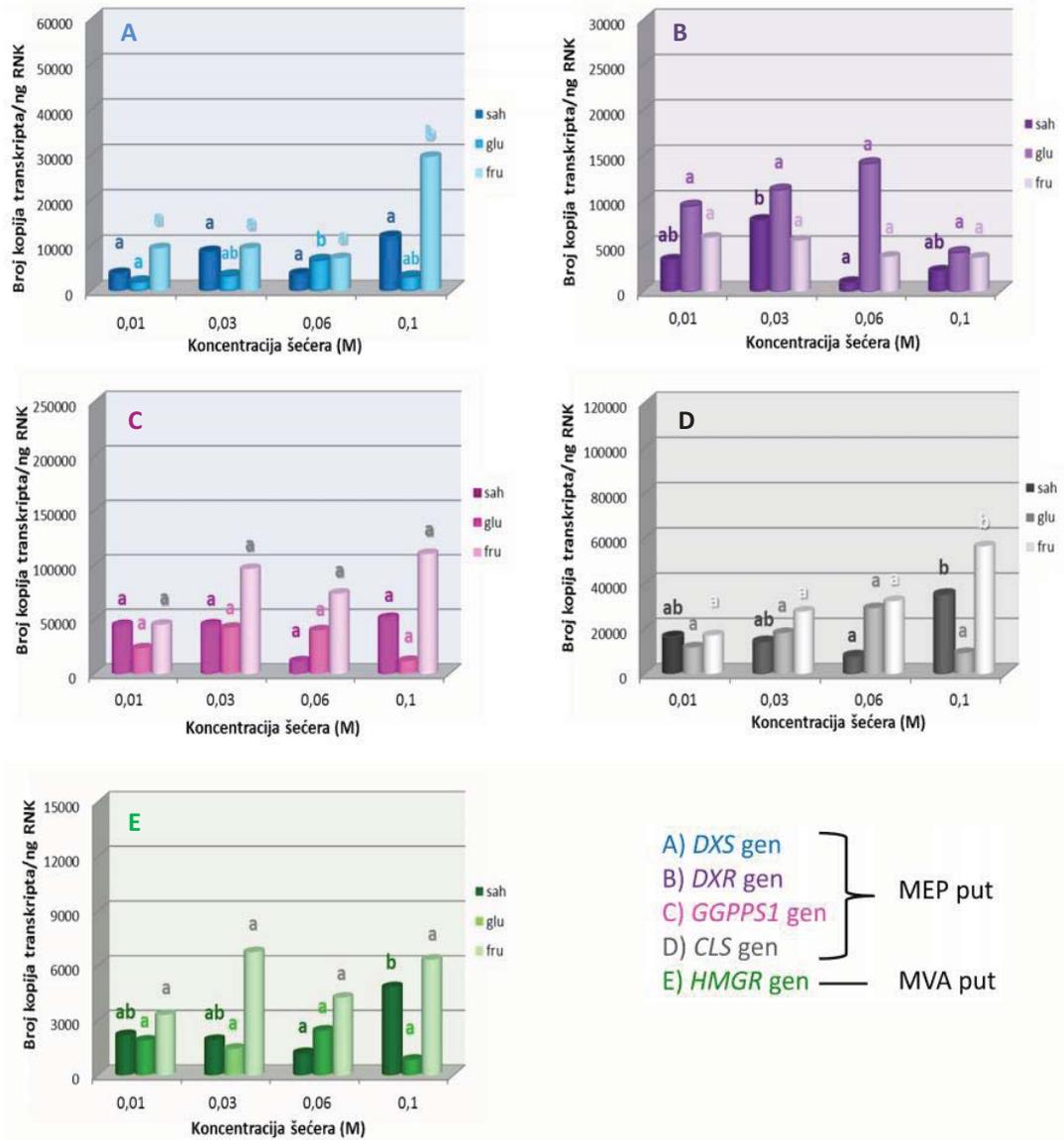
Slika 29. Primer dobro oblikovane standardne krive poznate koncentracije amplifikovanih PCR produkata *DXR* gena. Nagib iznosi -3,3, a vrednost R^2 je 0,99.

4.6.1.1. Efekat ugljenih hidrata na ekspresiju gena koji učestvuju u MVA i MEP biosintetskom putu

Izolacija RNK iz izdanaka koji su gajeni na 0,3 M koncentraciji sva tri šećera je bila neuspešna usled izuzetno lošeg fiziološkog stanja biljaka, te se nisu mogle sprovesti dalje analize. Stoga su prikazani rezultati ekspresije odgovarajućih gena u izdancima gajenim na 4 različite koncentracije šećera: opsega od 0,01 M do 0,1 M.

Rezultati ukazuju da nakon 6 nedelja gajenja izdanaka na hranljivoj podlozi sa dodatkom različitih koncentracija šećera nije došlo do promene ekspresije *DXR* i *GGPPS1* gena (**Slika 30B** i **30C**). Ekspresija *CLS* gena je statistički značajno veća u izdancima koji su rasli u prisustvu viših koncentracija fruktoze (**Slika 30D**). Glukoza i saharoza nisu značajno menjali ekspresiju ovog gena, izuzev 0,06 M saharoze u čijem prisustvu je došlo do statistički značajnog smanjenja ekspresije *CLS* gena. Sa povećanjem koncentracije fruktoze u podlozi rasla je i ekspresija *DXS* gena u izdancima. Promena u ekspresiji datog gena nije registrovana u izdancima gajenim na hranljivim podlogama sa dodatkom saharoze ili glukoze (**Slika 30A**).

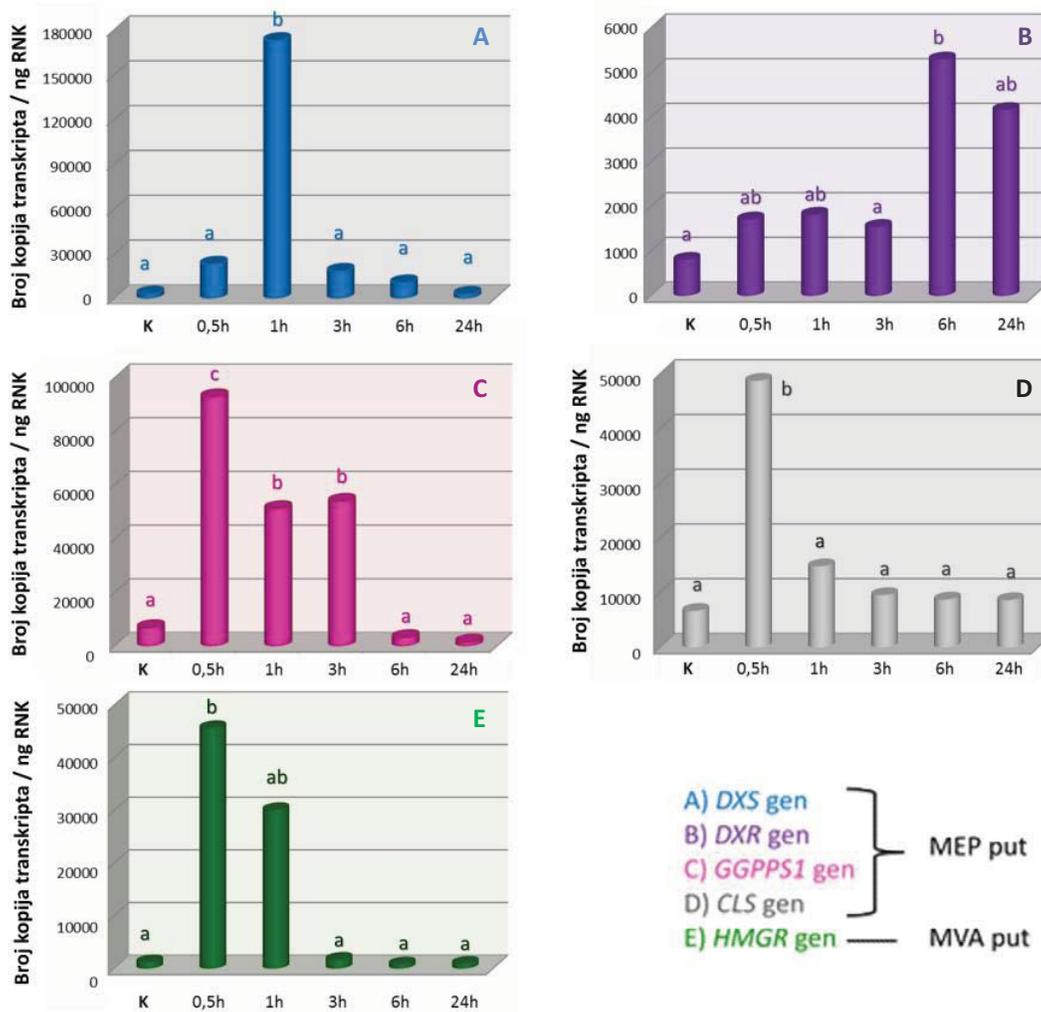
Prilikom ispitivanja ekspresije *HMGR* gena iz MVA puta uočeno je blago smanjenje ekspresije ovog gena u izdancima gajenim na 0,06 M saharozi, dok se ekspresija ovog gena nije statistički značajno menjala u izdancima gajenim na podlogama koje su sadržavale glukozu i fruktozu (Slika 30E).



Slika 30. Ekspresija odabranih gena MVA i MEP biosintetskog puta u izdancima *C. creticus* gajenih u kulturi *in vitro* na hranljivim podlogama sa dodatkom različitih šećera. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna biološka ponavljanja, a vrednosti označene istim slovima okvira grupe (iste boje) ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

4.6.1.2. Efekat povrede na ekspresiju gena koji učestvuju u MVA i MEP biosintetskom putu

Uzimajući u obzir da svi eksperimenti, pa i samo održavanje *in vitro* kultura zahteva odsecanje eksplantata sa izdanaka, proučavano je da li povreda biljaka može dovesti do promene ekspresije gena koji učestvuju u biosintetskom putu terpenoida, i naravno, kakvog tipa su te promene. Promena ekspresije posmatranih gena praćena je u pravilnim vremenskim intervalima nakon povređivanja 4 nedelje starih izdanaka raslih u kulturi *in vitro*. Listovi su povređivani zasecanjem, a rezultati su prikazani na **Slici 31**.



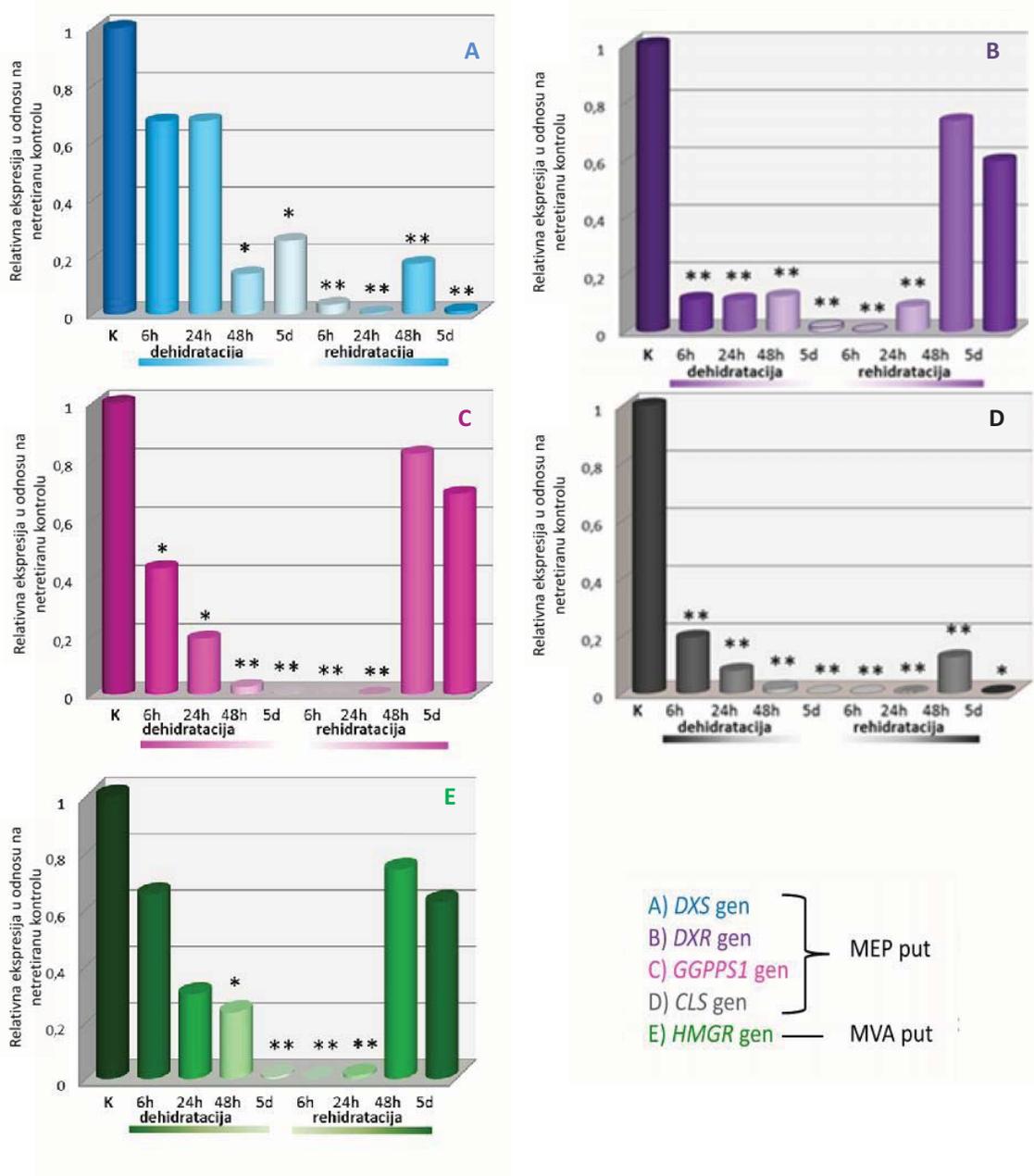
Slika 31. Efekat povrede na ekspresiju odabranih gena MVA i MEP biosintetskog puta u izdancima *C. creticus* gajenih u kulturi *in vitro*. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna biološka ponavljanja, a vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

Značajno povećanje ekspresije *CLS* i *GGPPSI* gena iz MEP puta, kao i ekspresije *HMGR* gena iz MVA puta uočeno je 30 minuta od povređivanja (**Slika 31C, 31D i 31E**). Nivo ekspresije *CLS* gena se već nakon 1 h vraćao na nivo kontrole (**Slika 31D**), dok se kod *GGPPSI* gena ovo dešavalo tek nakon 6h, a kod *HMGR* gena nakon 1h, odnosno 3h (**Slika 31C i 31E**). Nakon 1 h od povrede dolazilo je do naglog i velikog povećanja ekspresije *DXS* gena, da bi se već nakon 3 h ekspresija ovog gena smanjila na nivo ekspresije u netretiranim kontrolnim uzorcima (**Slika 31A**). Povećanje ekspresije *DXR* gena uočeno je tek nakon 6h, sa statistički značajnim smanjenjem nakon 24 h (**Slika 31B**).

4.6.1.3. Efekat procesa dehidracije/rehidracije na ekspresiju gena koji učestvuju u MVA i MEP biosintetskom putu

Da bi se izbegla variranja u ekspresiji gena koja nastaju usled odsecanja eksplantata, tj. nakon povrede, u eksperimentu gde je praćen efekat dehidracije/rehidracije za svaku posmatranu tačku postavljena je i kontrolna grupa izdanaka. Dobijene vrednosti nivoa ekspresije tretiranih izdanaka su normalizovane u odnosu na vrednost ekspresije odgovarajućih gena u kontrolnim izdancima kojima je pripisivana vrednost 1. Ovo je bilo neophodno pošto su se u datim eksperimentima prve proučavane tačke nalazile u okviru opsega povećanja ekspresije odabranih gena nastalog usled same povrede biljke.

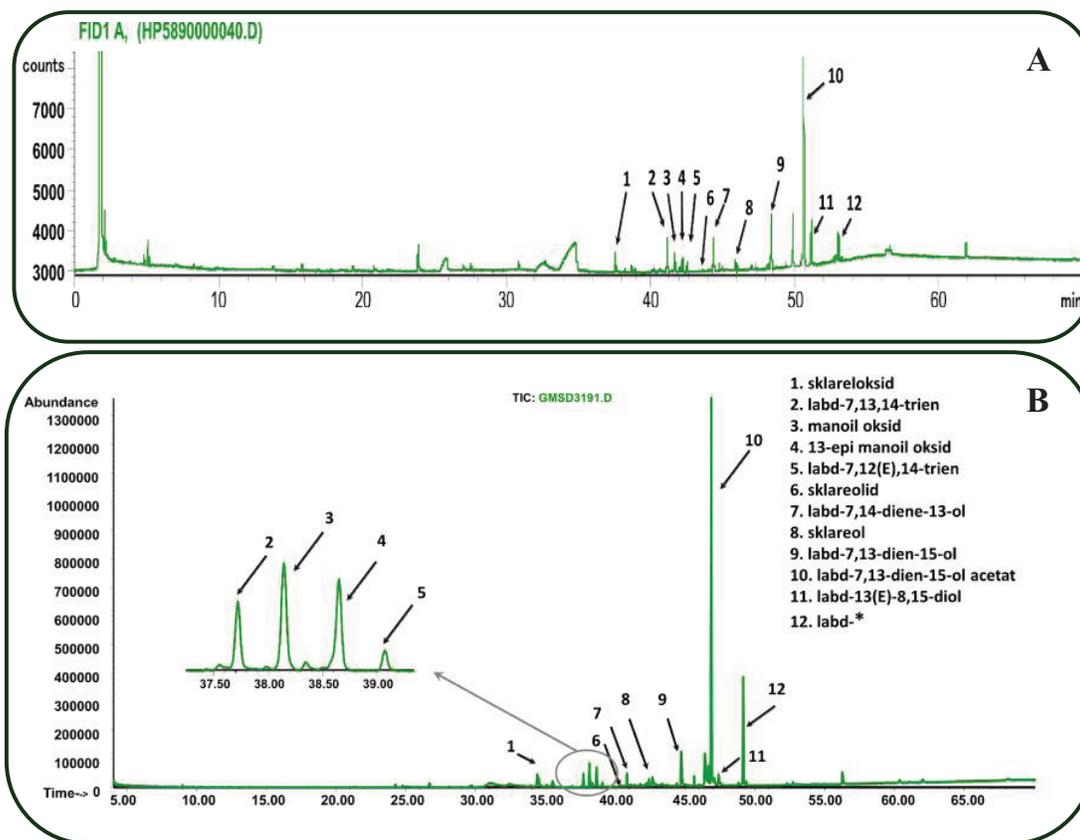
Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da tokom procesa dehidracije dolazi do značajnog smanjenja ekspresije svih gena MEP puta i to već nakon 6 h ako se posmatra ekspresija *DXR*, *GGPPSI* i *CLS* gena (**Slika 32**). Statistički značajno smanjenje ekspresije *DXS* gena uočava se nešto kasnije, tj. nakon 48 h od početka dehidracije (**Slika 32A**). Smanjenje ekspresije *HMGR* gena MVA puta tokom procesa dehidracije zabeleženo je takođe tek nakon 48h (**Slika 32E**). Toliko vremena je bilo potrebno i da se tokom procesa rehidracije izdanaka nivoi ekspresije datog gena, kao *DXR* i *GGPPSI* gena vrate na kontrolni nivo (**Slika 32B, 32C i 32E**). Međutim, smanjena ekspresija *CLS* i *DXS* gena uslovljena procesom dehidracije se zadržava i nakon 5 dana od početka rehidracije (**Slika 32A i 32D**).



Slika 32. Relativna ekspresija odabranih gena MVA i MEP biosintetskog puta u *in vitro* izdancima *C. creticus* tokom procesa dehidratacije/rehidratacije. Rezultati predstavljaju relativnu ekspresiju gena u tretiranim izdancima u odnosu na ekspresiju gena u kontrolnim netretiranim izdancima za svaku vremensku tačku. Značajnost razlika je utvrđena Studentovim t-testom: $p \leq 0,05$ (*) i $p \leq 0,01$ (**).

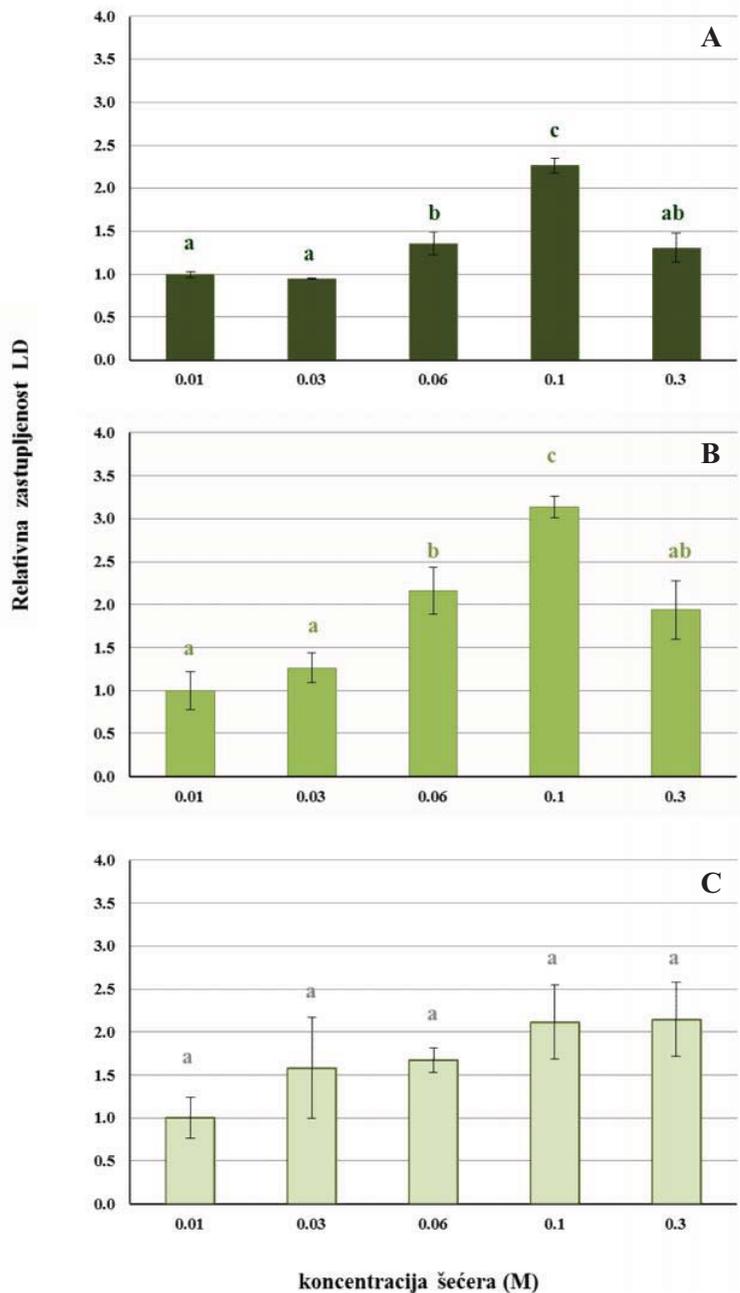
4.6.2. Sadržaj labdanskih diterpena u izdancima *C. creticus* gajenih *in vitro*

Sadržaj diterpena labdanskog tipa u izdancima *C. creticus* koji su gajeni *in vitro* pod uticajem različitih abiotičkih faktora je određen na osnovu GC-MS i GC-FID analiza uz korišćenje manuelne integracije pikova odabranih diterpena labdanskog tipa (11 identifikovanih i 1 neidentifikovan) prikazanih na **Slici 33**.



Slika 33. GC-FID i GC-MS analiza etanolnih ekstrakata *C. creticus*. **A)** GC-FID i **B)** GC-MS hromatogrami etanolnog ekstrakta izdanka *C. creticus*. Diterpeni labdanskog tipa čija se ukupna relativna zastupljenost merila su označeni brojevima od 1 do 12.

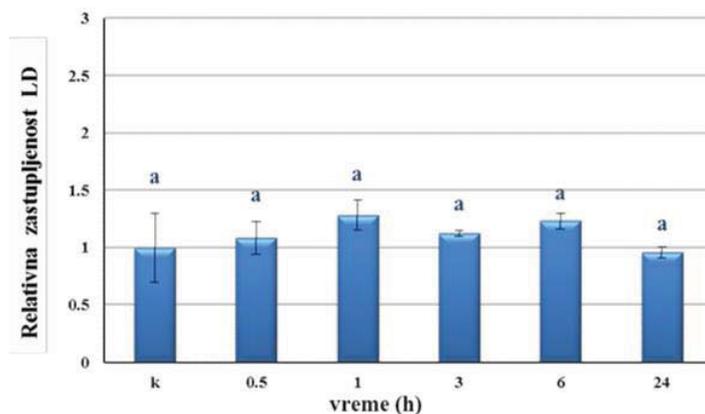
Sa porastom koncentracije saharoze i glukoze u podlozi uočava se porast relativne zastupljenosti LD (**Slika 34**). Optimalna koncentracija šećera za njihovu produkciju iznosila je 0,1 M. Dalje povećanje koncentracije šećera u podlozi dovodi do smanjenja relativnog sadržaja LD.



Slika 34. Relativna zastupljenost diterpena labdanskog tipa u izdancima *C. creticus* gajenim *in vitro* na podlogama sa različitim koncentracijama šećera: **A)** saharoze, **B)** glukoze, **C)** fruktoze. Stubići predstavljaju relativnu zastupljenost LD u izdancima gajenim na različitim koncentracijama određenog šećera u odnosu na relativnu zastupljenost LD u izdancima gajenim na 0.01M datog šećera. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

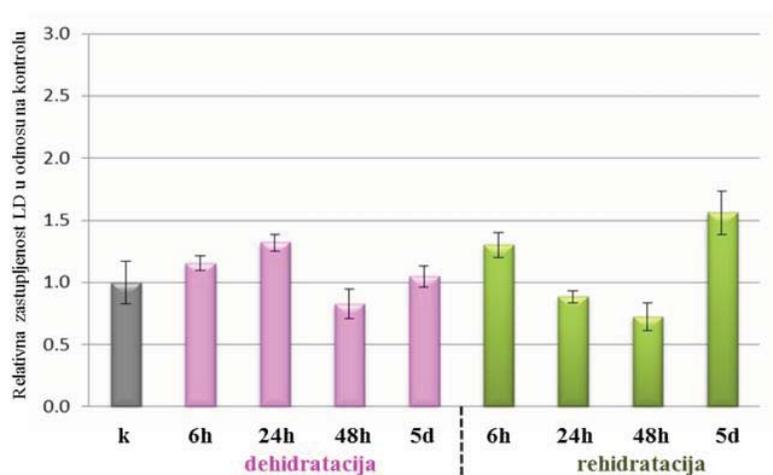
Relativna zastupljenost diterpena labdanskog tipa u izdancima *C. creticus* gajenim 6 nedelja na hranljivoj podlozi sa dodatkom 0,1 M saharoze i 0,1 M glukoze je bila statistički značajno povećana u odnosu na sadržaj ovih jedinjenja u ostalim izdancima (Slika 34A i Slika 34B). Različita koncentracija fruktoze nije dovela do promene ukupnog sadržaja LD u izdancima *C. creticus* gajenim *in vitro* (Slika 34C), a relativna količina labdanskih diterpena u izdancima gajenim na 0,01 M fruktozi je bila manja nego u onim gajenim na ekvimolarnim koncentracijama druga dva šećera.

Relativni sadržaj diterpena labdanskog tipa se nije značajno menjao u izdancima *C. creticus* gajenim *in vitro* koji su bili povređivani zasecanjem listova. Naime, relativni nivo LD je bio u granicama kontrolnih izdanaka, bez obzira koji je vremenski period prošao od same povrede (0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h ili 24 h). Rezultati su prikazani na Slici 35.



Slika 35. Relativna zastupljenost diterpena labdanskog tipa u *in vitro* izdancima *C. creticus* nakon povređivanja. Stubići predstavljaju normalizovanu relativnu zastupljenost LD u izdancima nakon 0,5h, 1h, 3h, 6h i 24h od povređivanja u odnosu na relativnu zastupljenost LD u kontrolnim izdancima (k). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

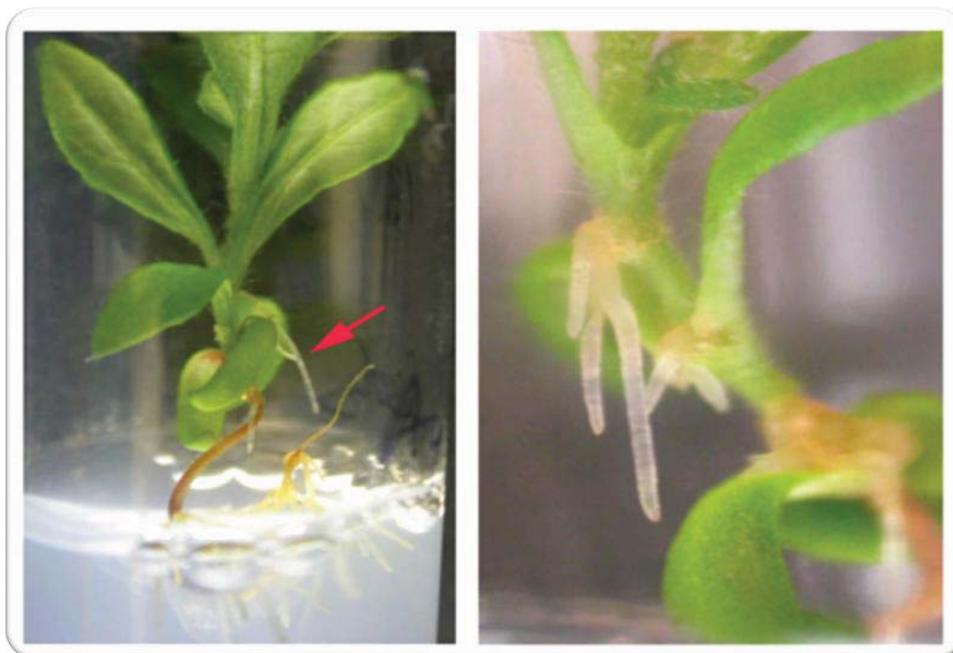
Relativna zastupljenost diterpena labdanskog tipa u *in vitro* izdancima *C. creticus* tokom procesa dehidracije/rehidracije prikazana je kao normalizovana vrednost u odnosu na relativnu zastupljenost LD u kontrolnim izdancima. Nije detektovana statistički značajna promena sadržaja ovih jedinjenja tokom ovog procesa (Slika 36).



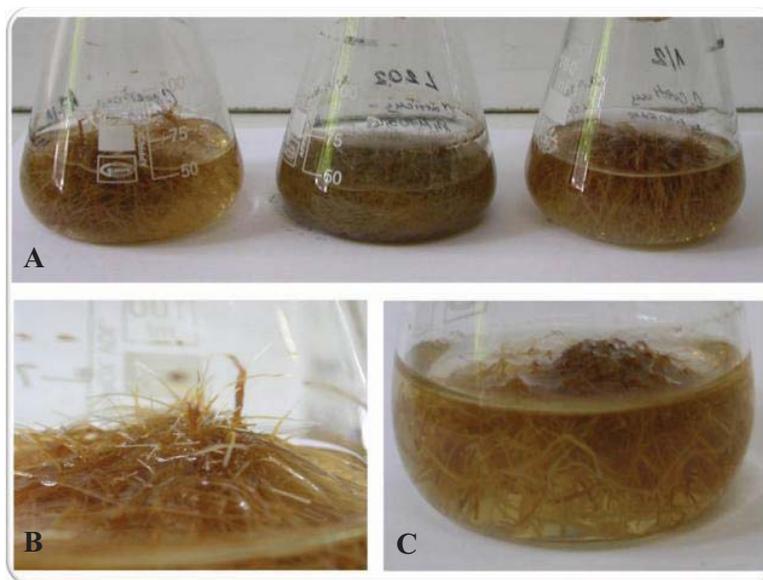
Slika 36. Relativna zastupljenost LD u izdancima *C. creticus* gajenim *in vitro* tokom procesa dehidracije/rehidracije. Stubići predstavljaju normalizovanu relativnu zastupljenost LD u tretiranim izdancima u odnosu na relativnu zastupljenost LD u kontrolnim netretiranim izdancima za svaku vremensku tačku (k). Prema Studentovim t-testu nije utvrđena statistički značajna razlika.

4.7. Genetička transformacija *C. creticus* pomoću *Agrobacterium rhizogenes*

Nakon 10 dana od momenta inokulacije sa *A. rhizogenes* na mestu infekcije pojavili su se transformisani korenovi (**Slika 37**). Efikasnost transformacije je definisana kao procenat inokuliranih mesta u nivou internodija na kojima je došlo do formiranja potencijalno transformisanih korenova i iznosila je 95%. Dvadeset tri potencijalno transformisana korena su po dostizanju dužine od oko 10-15 mm izolovana, i nakon tri pasaža na podlozi sa antibiotikom, kultivisana su u tečnoj MS podlozi bez dodatka antibiotika. Sve potencijalno transformisane kulture (linije) korenova *C. creticus* su pokazivale tipičan *hairy root* fenotip: ubrzan rast na medijumu bez regulatora rastezanja, izraženo bočno granjanje i gubitak gravitropskog odgovora (**Slika 38A** i **38B**). Kulture transformisanih korenova su se razlikovale po morfološkim karakteristikama od kulture netransformisanih korenova (**Slika 38C**), ali za razliku od transformisanih korenova drugih biljnih vrsta nije ih odlikovao veliki broj korenskih dlačica (**Slika 38B**).



Slika 37. Pojava i rast transformisanih korenova *Cistus creticus* na mestima inokulacije sa sojem A4M70GUS *A. rhizogenes*.

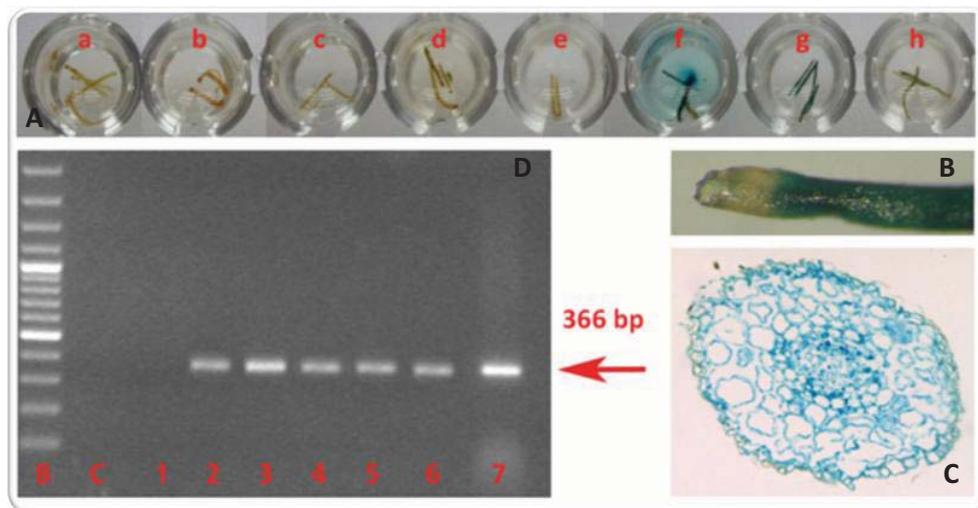


Slika 38. Izgled *in vitro* kultura korenova *C. creticus*. **A)** izgled kultura transformisanih korenova gajenih u tečnoj MS podlozi **B)** uvećan detalj izgleda kulture transformisanih korenova **C)** izgled kulture netransformisanih korenova gajenih u tečnoj MS podlozi

4.7.1. Histochemijska i PCR analiza transformisanih korenova

GUS testom je potvrđena aktivnost β -glukuronidaze kod 20 potencijalno transformisanih (od ukupno 23) korenova *C. creticus*. Intezitet i distribucija boje su varirali od klona do klona (Slika 39A), a u najvećem broju slučajeva se bojio apeks korena i /ili vaskularni cilindar (Slika 39B i 39C). Analizirani netransformisani korenovi nisu posedovali endogenu tzv. „GUS-like“ aktivnost (Slika 39A).

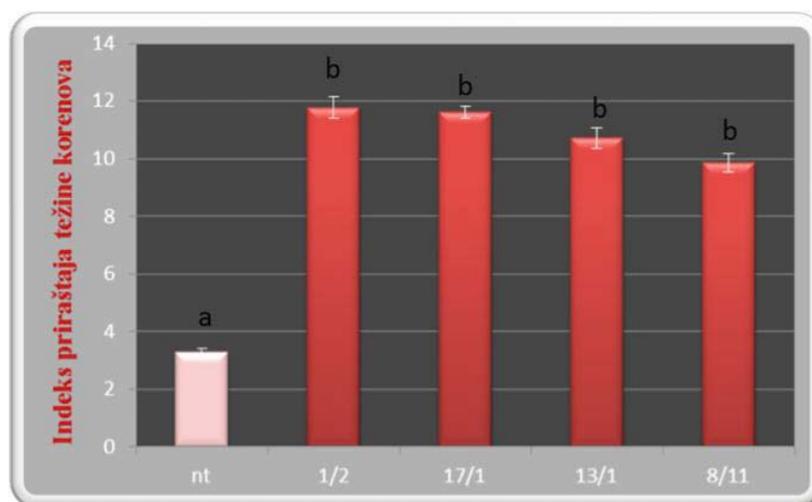
Četiri klona transformisanih korenova (17/1, 1/2, 13/1 i 8/11), koji su pokazali jasnu GUS ekspresiju i koji su intenzivno rasli na čvrstom i tečnom MS medijumu bez hormona, izdvojena su za dalja istraživanja. Prisustvo očekivanog fragmenta od 366 bp *uidA* sekvence potvrđeno je PCR reakcijom kod svih transformisanih klonova, kao i u pozitivnoj kontroli. U negativnoj kontroli, odnosno u DNK izolovanoj iz netransformisanih korenova i izdanaka, nije potvrđeno prisustvo *uidA* gena (Slika 39D).



Slika 39. Histochemijska i PCR analiza transformisanih korenova *C. creticus* **A)** GUS reakcija: **a)** netransformisani korenovi **b-h)** transformisani korenovi, **B)** detalj plavo obojenog transformisanog korena klona 1/2 koji ukazuje na pozitivnu GUS reakciju, **C)** vaskularni cilindar transformisanih korenova se intenzivno boji u plavo, **D)** PCR analiza genomske DNK izolovane iz izdanaka (**C**), netransformisanih korenova (**1**) i različitih klonova transformisanih korenova (**2-6**) *C. creticus* **B** – marker, **7** – *A. rhizogenes* A4M70GUS (pozitivna kontrola). Korišćeni su prajmeri koji su specifični za sekvencu *uidA* pomoću kojih je umnožen fragment veličine 366 bp.

4.7.2. Rast transformisanih korenova u kulturi *in vitro*

Rast netransformisanih i transformisanih korenova *C. creticus* je opisan indeksom priraštaja težine korenova utvrđenog nakon 4 nedelje rasta u tečnom MS medijumu bez regulatora rastenja. Korenovi svih transformisanih linija su povećali težinu 10-12 puta u toku 4 nedelje, dok su kontrolni netransformisani korenovi povećali težinu samo 3 puta (Slika 40). Kulture korenova transformisanih linija 17/1, 1/2, 8/11 i 13/1 već više od 3 godine održavaju visok kapacitet rasta u tečnoj kulturi (Slika 38A).

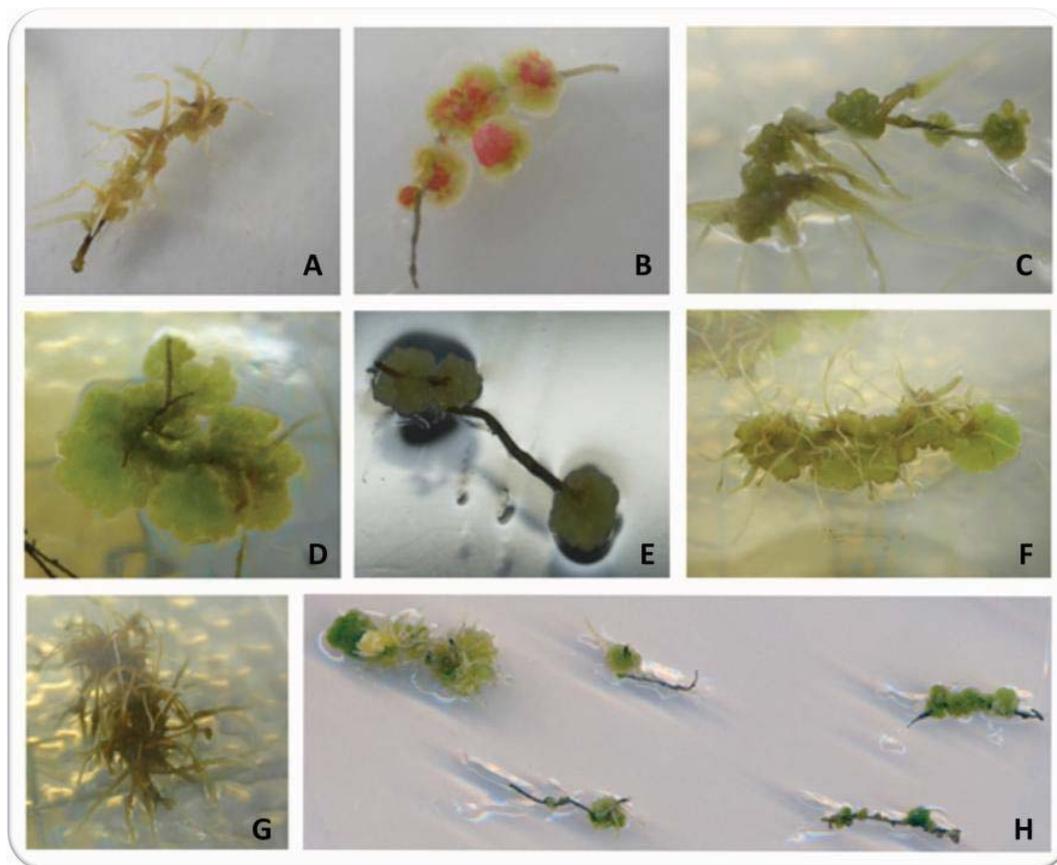


Slika 40. Indeks prirasta težine korenova nakon 4 nedelje gajenja u kulturi *in vitro* na tečnoj MS hranljivoj polozi. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna biološka ponavljanja \pm standardna greška, a vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

4.7.3. Indukcija regeneracije

U pokušaju dobijanja izdanaka transformisani korenovi klonova 1/2 i 17/1 su gajeni u tečnom i čvstom MS ili 1/2MS medijumu koji je sadržao jedan od citokinina i/ili auksina u koncentraciji 5, 10, 20 i 30 μ M. Tretman citokininima dovodio je do sličnih promena kod transformisanih korenova, nezavisno od vrste citokinina koji je korišćen. Naime, na medijumu koji je sadržao citokinin (ili je citokinin bio dodat u većoj koncentraciji od auksina), na korenovima su se formirale kalusne strukture različite boje i stepena rastresitosti, dok su rast i bočno grananje transformisanih korenova su bili inhibirani (Slika 41B, 41D, 41E, 41H). Tretman auksinima (ili tretman

gde su auksini prisutni u većoj koncentraciji od citokinina) dovedio je do formiranja kalusa manje veličine, ali i do izraženog rasta i bočnog grananja korenova (**Slika 41A i 41G**). Do formiranja regeneranata nije došlo ni posle 3 godine gajenja transformisanih korenova na različitim medijumima (sa i bez dodataka regulatora rastenja).

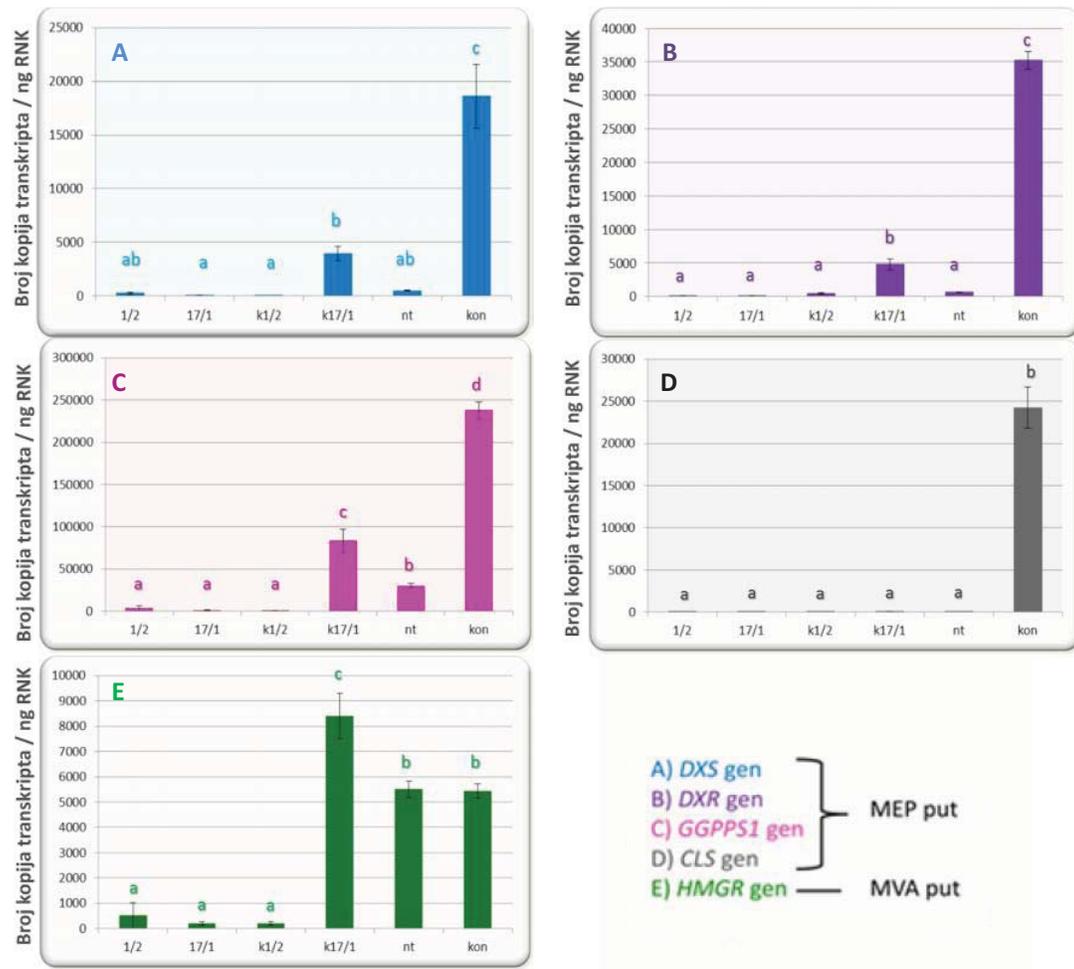


Slika 41. Uticaj različitih biljnih hormona na rast i regeneraciju transformisanih korenova istog klona (1/2). Podloge su sadržavale sledeće koncentracije biljnih hormona: **A)** 30 μM NAA + BAP 5 μM ; **B)** 30 μM TDZ **C)** KIN 10 μM ; **D)** 30 μM BAP + 10 μM NAA; **E)** 5 μM TDZ; **F)** BAP 30 μM +NAA 30 μM ; **G)** 5 μM BAP +30 μM NAA; **H)** 20 μM BAP

4.7.4. Ekspresija gena i sadržaj diterpena labdanskog tipa u transformisanim korenovima i kalusima

Analiza ekspresije gena koji učestvuju u biosintezi labdanskih diterpena praćena je u netransformisanim korenovima, transformisanim korenovima 1/2 i 17/1 i u

kalusima 1/2 i 17/1. Dobijeni rezultati su upoređivani sa vrednostima ekspresije gena u referentnoj kontroli, tj. izdancima iz *in vitro* kulture. Uočava se da geni koji učestvuju u MEP putu, tj. geni koji su učestvuju u biosintezi labdanskih diterpena, imaju značajno nižu ekspresiju u korenovima i kalusima u poređenju sa izdancima (Slika 42).



Slika 42. Ekspresija odabranih gena MVA i MEP biosintetskog puta u transformisanim korenovima (1/2 i 17/1), netransformisanim korenovima (nt), kalusima (1/2 i 17/1) *C. creticus* gajenim *in vitro*. Kao kontrolni uzorak (kon) je upotrebljen izdanak iz *in vitro* kulture. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna biološka ponavljanja, a vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fisher's LSD testu.

Interesantni rezultati su dobijeni za ekspresiju *HMGR* gena koji učestvuje u MVA putu i ne učestvuje direktno u biosintetskom putu labdanskih diterpena. Ekspresija ovog

gena je bila povećana u kalusu klona 17/1, a takođe veoma visoka u netransformisanim korenovima i u kontrolnim izdancima. Značajno niža ekspresija *HMGR* gena je zabeležena u transformisanim korenovima 1/2 i 17/1, kao i u kalusu 1/2.

Nakon analize ekspresije datih gena, urađena je i gasnomasena analiza korenova i kalusa gajenih u kulturi *in vitro*. GC-MS i GC-FID analizom nisu detektovani diterpeni labdanskog tipa koji su karakteristični za nadzemni deo biljke *C. creticus* u ispitivanim korenovima i kalusima.

4.8. Analiza biološke aktivnosti etanolnih ekstrakata *C. creticus*

Za analizu biološke aktivnosti korišćeni su suvi ostaci etanolnih ekstrakata izdanaka i korenova iz *in vitro* kulture koji su u daljem postupku rastvarani u odgovarajućem rastvaraču pogodnom za analizu biološke aktivnosti.

Radi pravilne inetrpretacije rezultata urađena je potpuna proširena hemijska analiza ekstrakata koja je obuhvatala gasnohromatografsku analizu korišćenjem dva detektora, spektrofotometrijsku analizu i kvalitativnu LTQ OrbiTrap MS analizu.

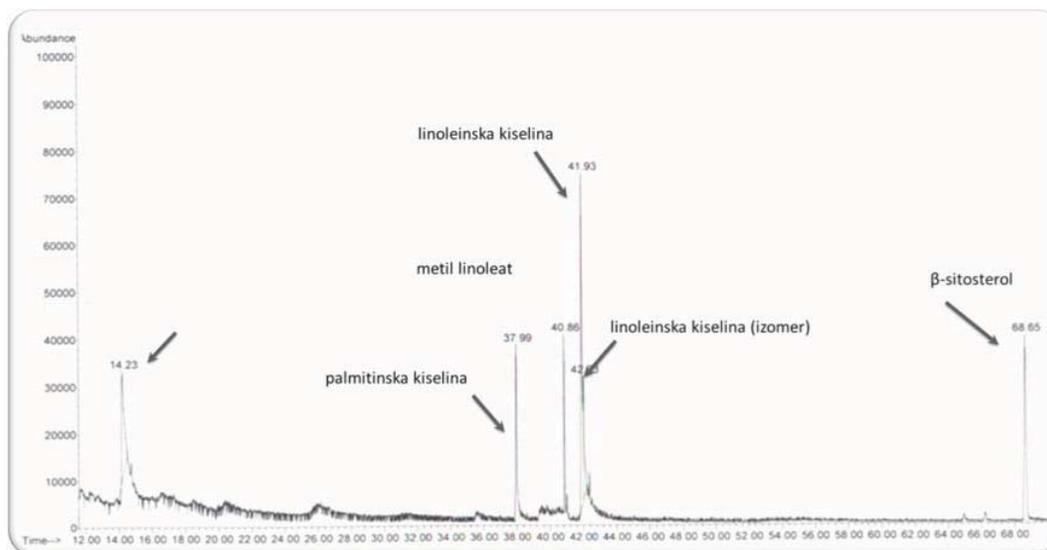
4.8.1. GC-MS i GC-FID analiza etanolnih ekstrakata

Kvalitativna i kvantitativna analiza uzoraka korišćenih za testove biološke aktivnosti vršena je gasnohromatografski uz korišćenje dva tipa detektora. Za početni biljni material su korišćeni 6 - 8 nedelja stari izdanci i korenovi *C. creticus* gajeni *in vitro*. Rezultati koji prikazuju zastupljenost karakterističnih LD u ekstraktima izdanaka klonova 4, 5 8 i 12 su prikazani u **Tabeli 17**.

Tabela 17. Hemijski sastav etanolnog ekstrakta izdanaka iz *in vitro* kulture *C. creticus* – prikazana je zastupljenost identifikovanih labdanskih ditrepena u različitim klonovima (%).

Jedinjenje	Klon 4	Klon 5	Klon 8	Klon 12
Sklareoloksid	0,65	0,52	0,64	0,52
Labd-7,13,14-trien	1,82	1,26	1,41	1,38
Manoil oksid	1,68	2,09	1,64	2,16
13-epi-Manoil oksid	1,40	1,23	0,89	1,86
Labd-7,12(E),14-trien	0,52	0,30	0,37	0,42
Sklareolid	0,36	0,24	0,46	0,24
Labd-7,14-dien-13-ol	0,54	0,90	1,17	0,59
Sklareol		0,35		0,26
Labd-7,13-dien-15-ol	7,32	5,99	5,92	4,79
3- α -Acetoksi-manoil	0,37	0,44	0,49	0,22
Labd-7,13-dien-15-ol acetat	37,31	37,08	34,35	34,86
Labd-13(E)-8,15-diol	3,98	2,99	3,15	2,53

Na osnovu gasnomasениh hromatograma etanolnih ekstrakata korenova (**Slika 43**) čija je biološka aktivnost ispitivana, može se zaključiti da se ovi ekstrakti sastoje od neisparljive i isparljive frakcije.



Slika 43. GC-MS hromatogram etanolnog ekstrakta netransformisanog korena *C. creticus* nakon 6 nedelja gajenja u kulturi *in vitro*

Glavni konstituenti neisparljive komponente pripadaju grupi ugljenih hidrata čiji su degradacioni produkti identifikovani (npr. 3,5-dihidroksi-6-metil-2,3-dihidro-4H-piran-4-on) ili nisu mogli sa sigurnošću da se identifikuju. U isparljivoj frakciji slobodne masne kiseline su bile najzastupljenije, kao i manje količine metil linoleata i β -sitosterola (**Tabela 18**). Ni u jednom od analiziranih ekstrakata nisu detektovani diterpeni labdanskog tipa, koji su karakteristični za nadzemni deo biljke *C. creticus*. Na osnovu veoma sličnih hromatograma ekstrakata svih testiranih klonova korena može se zaključiti da su ekstrakti kvalitativno i kvantitativno veoma slični.

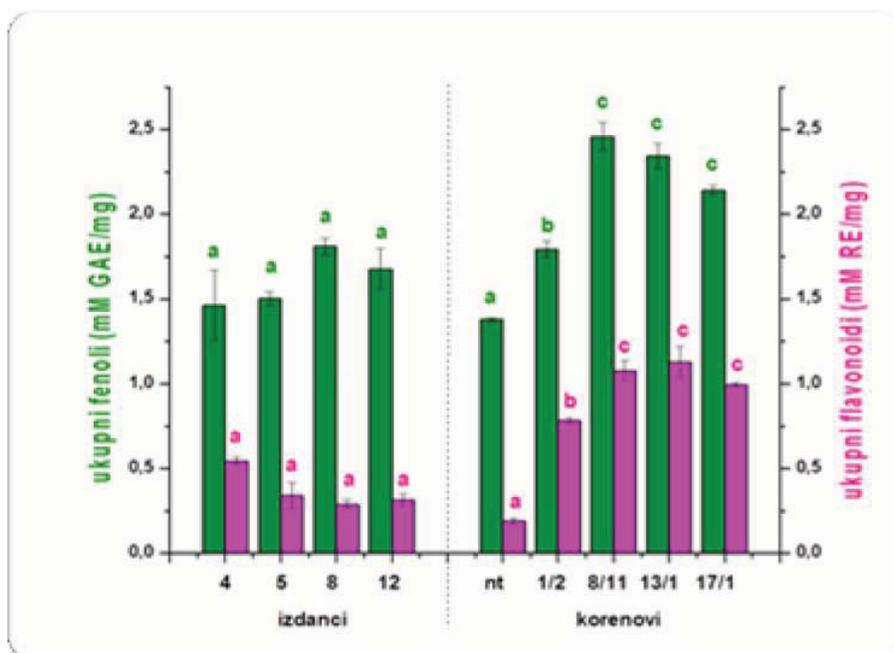
Tabela 18. Hemijski sastav etanolnog ekstrakta netransformisanog korena iz *in vitro* kulture *C. creticus* – prikazano je 6 identifikovanih komponenti u isparljivoj frakciji

Jedinjenje	KIE	KIL	% m/m
2,6-Dimetoksi-fenol (siringol)	1352,9	1346	1,37
Heksadekanska kiselina (palmitinska)	1962,8	1959	5,89
Metil linoleat	2086,3	2095	2,87
Linoleinska kiselina	2135,2	2132	11,76
Linoleinska kiselina (izomer)	2139,8		4,37
β -Sitosterol	3411,0	3408	1,16

KIE – eksperimentalno određen Kovačov indeks, KIL – Kovačov indeks iz literature, % m/m – procenat komponente u ekstraktu (masa na masu)

4.8.2. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida

Količina ukupnih fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima izdanaka i korenova (transformisanih i netransformisanih) *C. creticus* koji su gajeni u uslovima *in vitro* određena je spektrofotometrijskom metodom korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa (**Slika 44**). Rezultati pokazuju da ekstrakti izdanaka sadrže ujednačenu količinu fenolnih jedinjenja.

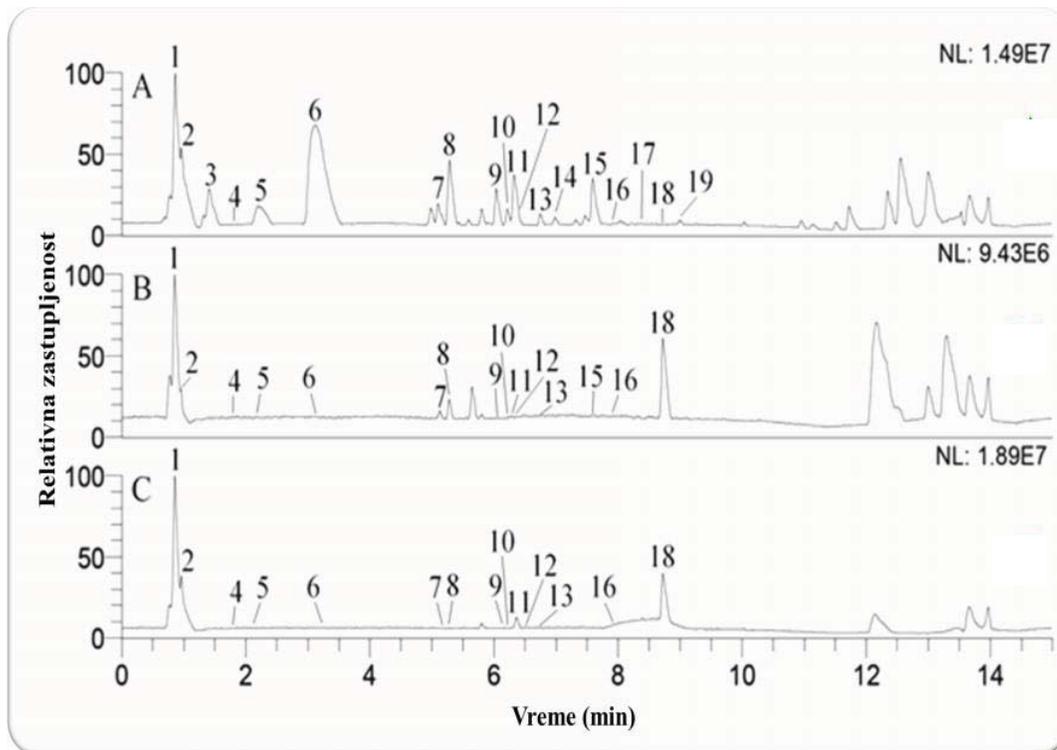


Slika 44. Količina ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima izdanaka (klonovi 4, 5, 8 i 12) i korenova (nt – netransformisani korenovi, 1/2, 8/11, 13/1, 17/1 – transformisani korenovi) *C. creticus* gajenih *in vitro*. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline odnosno rutina po gramu suve mase ekstrakta i predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti označene istim slovima u okviru pojedinačne grupe ekstrakata (izdanci ili korenovi) ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fišerovom LSD testu.

Među uzorcima korenova najmanje fenola sadži ekstrakt netransformisanih korenova, pa zatim ekstrakt transformisanog korena klon 1/2, dok najveću količinu sadrže ekstrakti transformisanih korenova 8/11, 13/1 i 17/1 (**Slika 44**).

U ekstraktima *C. creticus* spektrofotometrijski je određena i količina ukupnih flavonoida. Rezultati pokazuju da najveću količinu flavonoida sadrže ekstrakti transformisanih korenova 8/11, 13/1 i 17/1, nešto manju ekstrakt transformisanog korena 1/2, a najmanju ekstrakt netransformisanog korena. Među ekstraktima različitih klonova izdanaka *C. creticus*, nije postojala statistički značajna razlika u količini ukupnih flavonoida (**Slika 44**).

Kvalitativna analiza fenola i flavonoida je urađena UHPLC/LTQ - OrbiTrap MS analizom. Jedinjenja su identifikovana na osnovu odgovarajućih spektralnih karakteristika: masenog spektra, tačne mase, karakterističnih retencionih vremena i karakteristične fragmentacije. Dobijeni rezultati su prikazani na **Slici 45** i u **Tabeli 19**.



Slika 45. UHPLC/LTQ - OrbiTrap MS analiza ekstrakata. UHPLC/LTQ - OrbiTrap MS hromatogram ekstrakta **A)** izdanka, **B)** transformisanog korena, **C)** netransformisanog korena. Identifikovana karakteristična jedinjenja su označena na hromatogramu brojevima od 1-19 i prikazana u Tabeli 19.

Tabela 19. Detektovana jedinjenja u etanolnim ekstraktima *C. creticus* UHPLC/LTQ - OrbiTrap MS analizom.

Br. pika ^a	Jedinjenje	Molek. formula	t _R , min	Tačna masa, [M-H] ⁻	Izačunata masa, [M-H] ⁻	Δ ppm	MS/MS Fragmenti, (%)
1	Hininska kiselina	C ₇ H ₁₂ O ₆	0,90	191,05649	191,05556	4,87	191(100), 173(70), 171(30), 127(100)
2	Jabučna kiselina	C ₄ H ₆ O ₅	0,97	133,01436	133,01370	4,96	133(70), 115(100)
3	Heksozid galne kiseline	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	1,41	331,06744	331,06652	2,78	271(70), 211(20), 193(10), 169(100), 151(5), 125(10)
4	Galna kiselina ^b	C ₇ H ₆ O ₅	1,82	169,01453	169,01370	4,91	151(5), 125(100)
5	Dimer galokatehina	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	2,20	609,12567	609,12443	2,04	591(10), 483(10), 441(100), 423(50), 305(25)
6	Galokatehin ^b	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	3,11	305,06711	305,06613	3,21	287(10), 261(40), 247(20), 221(90), 219(80), 179(100)
7	Dimer katehina	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	5,12	577,13586	577,13460	2,18	559(10), 451(25), 425(100), 407(50), 289(20)
8	Katehin ^b	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	5,29	289,07227	289,07121	3,67	245(100), 205(40), 179(15)
9	Derivat hidroksicimene kiseline	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	6,09	371,09906	371,09782	3,34	353(5), 249(100), 231(10)
10	Kvercetin rutinozid ^b	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	6,22	609,14712	609,14556	2,56	343(5), 301(100), 300(30), 271(5), 255(5)
11	Miricetin ramnozid	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	6,32	463,08859	463,08765	2,03	317(50), 316(100), 300(10)
12	Elagična kiselina ^b	C ₁₄ H ₆ O ₈	6,41	300,99957	300,99844	3,75	301(50), 284(30), 257(100), 229(70), 185(40)
13	Kvercetin ramnozid	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	6,75	447,09421	447,09274	3,29	301(100), 300(50)
14	Ruzmarinska kiselina ^b	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	6,98	359,07819	359,07669	4,18	223(15), 197(15), 179(15), 161(100), 133(5)
15	Galokatehin-katehin	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	7,59	593,13092	593,12952	2,36	447(10), 307(5), 285(100), 284(10)
16	Kvercetin ^b	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	7,84	301,03620	301,03483	4,55	273(20), 267(20), 179(100), 151(80)
17	Apigenin ^b	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	8,41	269,04626	269,04500	4,68	255(100), 201(30), 151(25)
18	Neidentifik.	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	8,72	329,23376	329,23280	2,92	329(30), 311(25), 293(20), 229(100), 211(85)
19	Hesperetin ^b	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	9,08	301,07248	301,07121	4,22	286(100), 283(45), 257(40), 242(60)

^a Broj pika na **Slici 45**; ^b Potvrđeno korišćenjem standarda; t_r srednje očekivano retenciono vreme; Δ ppm – srednje odstupanje od tačne mase

Hininska kiselina, galokatehin, katehin predstavljaju neka od karakterističnih fenolnih jedinjenja koja su identifikovana u ekstraktima izdanaka i korenova. Za razliku od izdanaka, u korenovima nisu identifikovani heksozid galne kiseline (pik 3), apigenin (pik 17), ruzmarinska kiselina (pik 14) i hesperetin (pik 19). Takođe, u transformisanim korenovima je relativna zastupljenost svih jedinjenja bila veća nego u netransformisanim.

4.8.3. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost ekstrakata izdanaka i korenova *C. creticus* gajenih u kulturi *in vitro* određena je primenom metode neutralizacije DPPH radikala. U **Tabeli 20** i **21** su prikazane IC_{50} vrednosti (koncentracije suvog ekstrakta koje su potrebne za neutralizaciju 50% DPPH radikala), kao i antioksidativni kapacitet galne kiseline, kao referentnog jedinjenja.

Tabela 20. Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata izdanaka *C. creticus* gajenih *in vitro*. Rezultati su izraženi kao IC_{50} i predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fišerovom *LSD* testu. (IC_{50} galne kiseline = $62,99 \pm 1,41$)

Izdanci <i>C. creticus</i> klon	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]
4	$26,56 \pm 6,02$ a
5	$28,40 \pm 0,34$ a
8	$16,97 \pm 1,39$ a
12	$27,16 \pm 1,20$ a

Ekstrakti izdanaka različitih klonova *C. creticus* gajenih *in vitro* su posedovali sličnu antioksidativnu aktivnost koja je bila bolja u odnosu na antioksidativnu aktivnost galne kiseline (**Tabela 20**). Ekstrakt netransformisanog korena *C. creticus* je pokazao slabiji antioksidativni potencijal u odnosu na ekstrakt transformisanog korena klona 8/11, koji je pokazao nabolju antioksidativnu aktivnost među korenovima (**Tabela 21**).

Tabela 21. Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata korenova *C. creticus* gajenih *in vitro*. Rezultati su izraženi kao IC_{50} i predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$) prema Fišerovom *LSD* testu. (IC_{50} galne kiseline = $62,99 \pm 1,41$)

Korenovi <i>C. creticus</i> klon	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]
1/2	$28,33 \pm 2,23$ ab
13/1	$23,11 \pm 3,23$ ab
8/11	$14,49 \pm 0,89$ a
17/1	$23,08 \pm 2,04$ ab
nt	$41,21 \pm 10,65$ b

Antioksidativni potencijal ekstrakata transformisanih korenova bio je bolji u poređenju sa antioksidativnom aktivnošću galne kiseline. Dobijeni rezultati antioksidativnog potencijala različitih ekstrakata su u skladu sa količinom ukupnih fenola i flavonoida u njima: ekstrakti sa većom količinom fenolnih jedinjenja su imali bolji antioksidativni potencijal (**Slika 44, Tabela 20 i 21**).

4.8.4. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobno dejstvo etanolnih ekstrakata izdanaka i korenova *C. creticus* na Gram pozitivne i Gram negativne vrste bakterija i mikrogljive 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 (MBC) i minimalna fungicidna koncentracija (MFC). Aktivnost ekstrakata je upoređivana sa referentnim antibioticima streptomycinom i ampicilinom, odnosno sa komercijalnim fungicidima bifonazolom i ketokonazolom.

Rezultati antibakterijske aktivnosti su prikazani u **Tabeli 22**. Svi ekstrakti su pokazali jaku antibakterijsku aktivnost na sve testirane organizme. MIC vrednosti ekstrakta izdanaka *C. creticus* su bili u opsegu od 0,005 do 0,1 mg/ml, a MBC u opsegu od 0,04 – 0,14 mg/ml. Antibakterijsku aktivnost ekstrakta izdanaka se nije mnogo

razlikovala između klonova. Najsenzitivnija bakterija je bila *B. cereus*, dok je *E. cloacae* bila najrezistentnija. Svi ekstrakti klonova izdanaka *C. creticus* gajenih *in vitro* su pokazali bolju antibakterijsku aktivnost u odnosu na streptomycin (MIC 0,04 - 0,26mg/ml; MBC 0,09 - 0,52 mg/ml) i mnogo bolju u odnosu na ampicilin ((MIC 0,25 - 0,74 mg/ml; MBC 0,37 - 1,24 mg/ml). Zapravo testirani antibiotici su pokazali manju antibakterijsku aktivnost u odnosu na klonove izdanaka, čak 3 do 30 puta manju.

Antibakterijska aktivnost ekstrakata transformisanih korenova *C. creticus* su prikazane u **Tabeli 22**. MIC je bila u opsegu od 0,01 – 0,1 mg/ml, a MBC u opsegu od 0,02 – 0,16 mg/ml. Najvišu aktivnost je imao klon 13/1 a najslabiju klon 1/2. Najveću senzitivnost na ove ekstrakte je pokazala vrsta *P. aeruginosa*, dok su vrste *S. aureus* i *E. coli* bile najrezistentnije. Ekstrakt netransformisanog korena je pokazao antibakterijsku aktivnost sledećih karakteristika: MIC u rang 0,03 – 0,06 mg/ml i MBC u opsegu 0,03 – 0,18 mg/ml. Uopšteno ekstrakt netransformisanog korena je pokazao blago slabiju aktivnost od ekstrakta transformisanih korenova, izuzev u slučaju vrste *E. coli*, gde je inhibitorna aktivnost bila 2 puta, a baktericidna oko 5 puta jača. Svi testirani ekstrakti korenova su imali jaču aktivnost u odnosu na testirane antibiotike, izuzev u slučaju kultura *S. aureus* (**Tabela 22**). Antibakterijska aktivnost ekstrakata izdanaka je bila bolja u odnosu na antibakterijsku aktivnost transformisanih korenova sa izuzetkom *E. cloacae*.

Rezultati antifungalne aktivnosti testiranih ekstrakata su prikazani u **Tabeli 23**. MIC vrednosti ekstrakata izdanaka *C. creticus* kretale su se u opsegu od 0,05 – 0,14 mg/ml, a MFC od 0,10 – 0,20 mg/ml. Ekstrakt izdanaka klona 12 posedovao je najvišu, a ekstrakt izdanaka klona 4 najnižu antifungalnu aktivnost. *A. versicolor* je bila najsenzitivnija vrsta, dok je *P. funiculosum* bila najrezistentnija vrsta. Svi ekstrakti izdanaka su pokazali sličnu ili nešto bolju antifungalnu aktivnost od komercijalnog jedinjenja bifonazola (MIC: 0,10 – 0,20 mg/ml i MFC: 0,20 – 0,25 mg/ml), ali mnogo bolju u odnosu na ketonazol (MIC: 0,20 – 2,50 mg/ml i MFC: 0,30 – 3,50 mg/ml.), u pojedinim slučajevima čak 17 puta veću (**Tabela 23**).

Tabela 22. Antibakterijska aktivnost ekstrakta izdanaka i korenova *C. creticus* (mg/ml)

MIC - minimalna inhibitorna koncentracija, MBC - minimalna baktericidna koncentracija

Bakterija	Izdanci						Korenovi						Kontrola	
	klon 4	klon 5	klon 8	klon 12	tr. koren klon 17/1	tr. koren klon 13/1	tr. koren klon 1/2	tr. koren klon 8/11	netransf. koren	Str	Amp			
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC	0,01	0,02	0,02	0,06	0,06	0,10	0,10	0,06	0,04	0,25			
	MBC	0,04	0,04	0,04	0,16	0,14	0,14	0,14	0,18	0,09	0,37			
<i>Bacillus cereus</i>	MIC	0,005	0,01	0,01	0,01	0,06	0,02	0,02	0,04	0,09	0,25			
	MBC	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,10	0,04	0,05	0,17	0,37			
<i>Micrococcus flavus</i>	MIC	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,06	0,02	0,06	0,17	0,25			
	MBC	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,07	0,07	0,10	0,34	0,37			
<i>Listeria monocytogenes</i>	MIC	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,06	0,06	0,06	0,17	0,37			
	MBC	0,04	0,06	0,06	0,06	0,14	0,10	0,10	0,10	0,34	0,49			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC	0,10	0,10	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,04	0,17	0,74			
	MBC	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,07	0,06	0,05	0,34	1,24			
<i>Salmonella typhimurium</i>	MIC	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04	0,17	0,37			
	MBC	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,10	0,10	0,05	0,34	0,49			
<i>Escherichia coli</i>	MIC	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,06	0,06	0,03	0,17	0,25			
	MBC	0,05	0,06	0,06	0,05	0,14	0,14	0,14	0,03	0,34	0,49			
<i>Enterobacter cloacae</i>	MIC	0,10	0,10	0,10	0,10	0,02	0,04	0,08	0,04	0,26	0,37			
	MBC	0,14	0,14	0,14	0,14	0,06	0,10	0,10	0,18	0,52	0,74			

Tabela 23. Antifungalna aktivnost ekstraktata izdanaka i korenova *C. creticus* (mg/ml)

MIC - minimalna inhibitorna koncentracija, MFC - minimalna fungicidna koncentracija

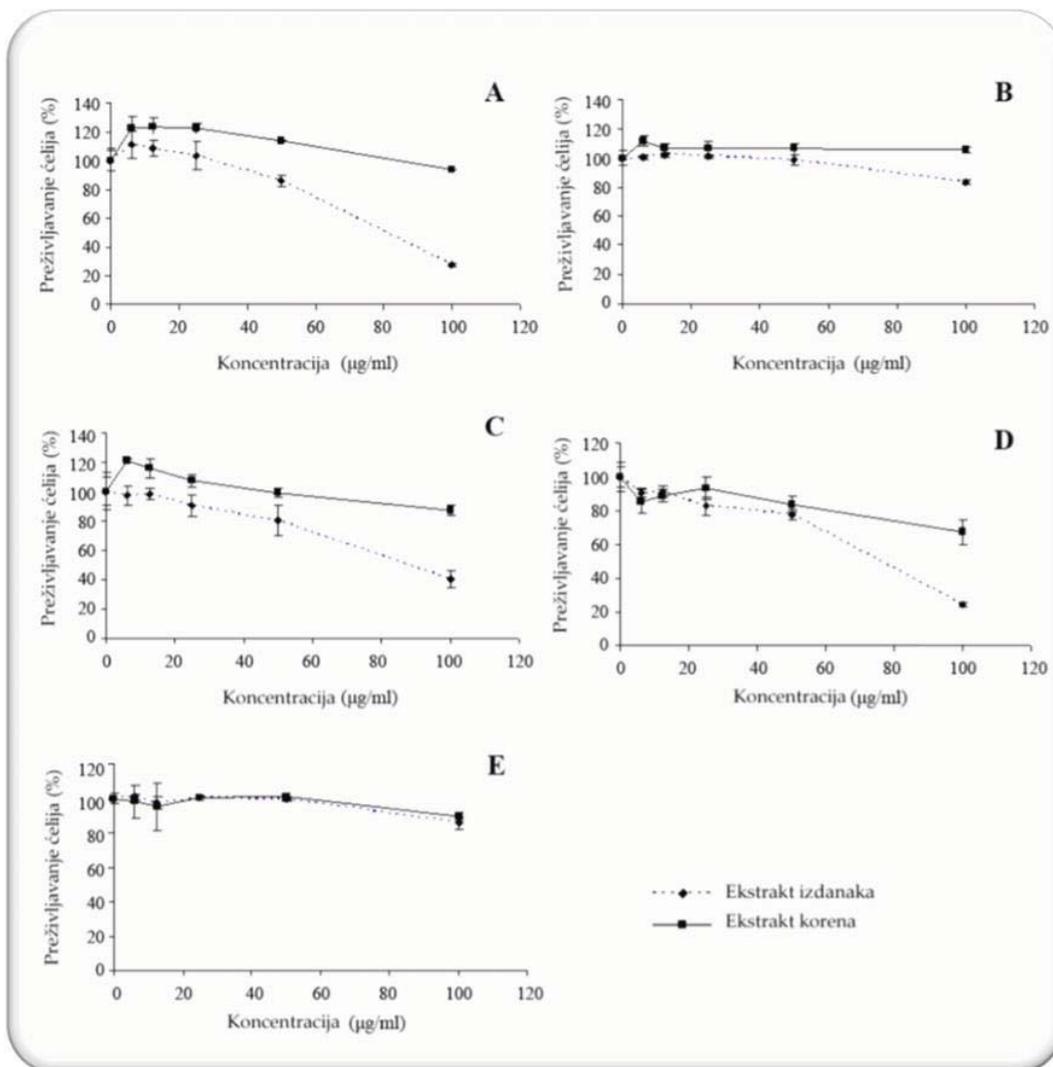
	Izdanci						Korenovi						Kontrola		
	klon 4	klon 5	klon 8	klon 12	tr. koren klon 17/1	tr. koren klon 13/1	tr. koren klon 1/2	tr. koren klon 8/11	netransf. koren	Bif	Keto				
Gljive	MIC														
	MFC														
<i>Aspergillus fumigatus</i>		0,14	0,14	0,05	0,10	0,14	0,14	0,14	0,10	0,14	0,10	0,15	0,20		
		0,20	0,20	0,14	0,24	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,50		
<i>Aspergillus versicolor</i>		0,06	0,06	0,14	0,10	0,14	0,14	0,14	0,06	0,14	0,06	0,10	0,20		
		0,14	0,10	0,14	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,50		
<i>Aspergillus flavus</i>		0,14	0,14	0,05	0,14	0,14	0,14	0,14	0,10	0,14	0,10	0,15	1,50		
		0,20	0,20	0,14	0,14	0,20	0,20	0,20	0,14	0,20	0,14	0,20	2,00		
<i>Penicillium ochrochloron</i>		0,14	0,05	0,10	0,05	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	1,00		
		0,16	0,14	0,16	0,14	0,16	0,16	0,20	0,16	0,16	0,16	0,20	1,00		
<i>Penicillium funiculosum</i>		0,14	0,14	0,14	0,14	0,16	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,20	0,20		
		0,20	0,20	0,20	0,14	0,20	0,20	0,20	0,16	0,20	0,16	0,25	0,50		
<i>Trichoderma viride</i>		0,14	0,10	0,14	0,10	0,14	0,14	0,14	0,10	0,14	0,10	0,20	2,50		
		0,20	0,14	0,20	0,14	0,14	0,20	0,20	0,14	0,20	0,14	0,25	3,50		
<i>Fusarium verticillioides</i>		0,14	0,05	0,10	0,05	0,05	0,10	0,10	0,14	0,14	0,14	0,10	0,20		
		0,16	0,14	0,16	0,14	0,16	0,16	0,20	0,16	0,20	0,20	0,20	0,30		

Ekstrakti transformisanih korenova su pokazivali antifungalnu aktivnost u opsegu od MIC 0,05 – 0,14 mg/ml i MFC 0,14 – 0,24 mg/ml (**Tabela 23**), pri čemu je *A. fumigatus* je bila najrezistentnija vrsta, a *F. verticillioides* najsenzitivnija. Ekstrakt netransformisanog korena je pokazao sličnu aktivnost kao i ekstrakti transformisanih korenova (MIC 0,06 - 0,14 mg/ml i MFC 0,14 - 0,20 mg/ml). Kao i ekstrakti izdanaka, ekstrakti korenova su pokazali sličnu antifungalnu aktivnost kao bifonazol, ali značajno bolju od ketokonazola.

Sažeto rečeno svi ekstrakti su imali bolju antibakterijsku nego antifungalnu aktivnost, pri čemu je njihova antimikrobna aktivnost bila slična ili bolja od streptomicina i bifonazola, a značajno veća od ampicilina i ketonazola.

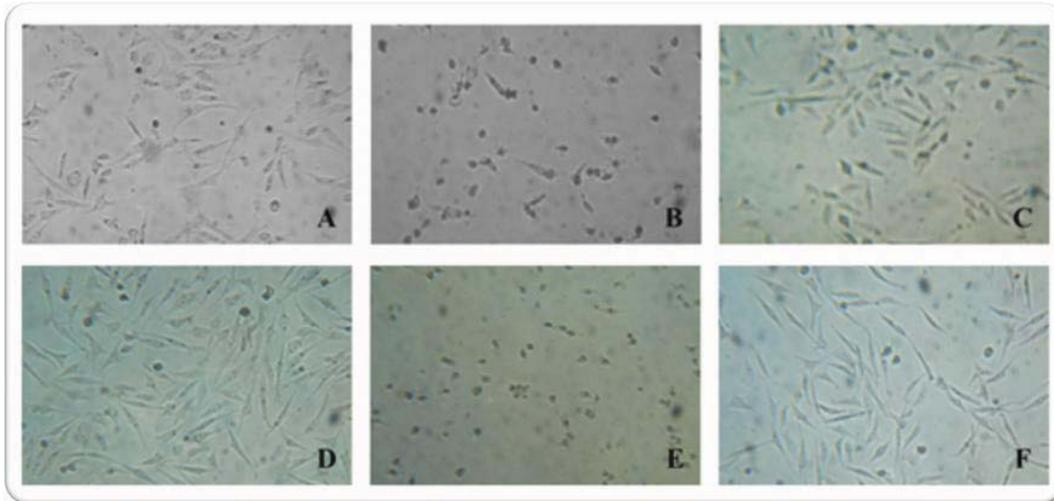
4.8.5. Citotoksična aktivnost

Citotoksična aktivnost ekstrakata izdanaka i korenova je ispitivana na pet tumorskih ćelijskih linija korišćenjem SRB eseja. Na **Slici 46** prikazani su reprezentativni rezultati sa ekstraktima izdanaka klona 12 i ekstraktima netransformisanog korena. Ekstrakt korena, u celom opsegu ispitivanih koncentracija, nije uticao na rast testiranih tumorskih ćelija, kao što ni ekstrakt izdanaka nije imao citotoksičnu aktivnost na kulture LS-174 i MDA-MB-361 ćelija. Međutim, ekstrakti izdanaka su pokazali citotoksičnu aktivnost na HeLa, MDA-MB-453 i FemX ćelijama. IC₅₀ ekstrakta izdanaka je iznosio 80,83 µg/ml za HeLa ćelije (**Slika 46A**), 76,18 µg/ml za MDA-MB-453 (**Slika 46D**) i 87,52 µg/ml za FemX (**Slika 46C**) ćelijske kulture. Cisplatina je korišćena kao standardni citotoksični agens, a njena IC₅₀ vrednost za navedene ćelije je iznosila < 2.2 µg/ml. Slične vrednosti su dobijene i kada su u eksperimentu testirani i ekstrakti izdanaka ostala tri klona (4, 5 i 8). Ekstrakti transformisanih korenova, isto kao i ekstrakt netransformisanog korena, nisu pokazali citotoksičnu aktivnost.



Slika 46. Reprezentativni dijagram ćelijskog preživljavanja nakon 72 h kontinualnog delovanja ekstrakta **A)** HeLa (ćelije humanog karcinoma cerviksa), **B)** MDA-MB-361 (ćelije karcinoma dojke), **C)** FemX (ćelije humanog melanoma) **D)** MDA-MB-453 (ćelije karcinoma dojke) **E)** LS-174 (ćelije humanog karcinoma kolona).

Analiza morfologije HeLa i MDA-MB-453 ćelija korišćenjem invertnog mikroskopa prikazana je na **Slici 47**. Uočeno je da su se nakon 72 h od dodavanja 100 µg/ml ekstrakta izdanaka *C. creticus* tretirane ćelije smanjile i zaoblile (**Slika 47B** i **47E**), tj. pojavile su se morfološke karakteristike tipične za apoptozu. Kod netretiranih, kontrolnih ćelija (**Slika 47A** i **47D**), kao i kod ćelija tretiranih ekstraktom korena *C. creticus* (**Slika 47C** i **47F**), nije došlo do promene u morfologiji.



Slika 47. Ispitivanje morfologije HeLa i MDA-MB-453 ćelija tretiranih ekstraktima izdanaka i korena *C. creticus* iz *in vitro* culture. **A)** netretirane HeLa ćelije (kontrola) **B)** HeLa ćelije tretirane ekstraktom izdanka nakon 72 h **C)** HeLa ćelije tretirane ekstraktom korena nakon 72 h **D)** netretirane MDA-MB-453 ćelije (kontrola) **E)** MDA-MB-453 ćelije tretirane ekstraktom izdanka nakon 72 h **F)** MDA-MB-453 ćelije tretirane ekstraktom korena nakon 72 h.

5. DISKUSIJA

Sekundarni metaboliti omogućavaju biljkama da se adaptiraju na različite ekološke faktore i smatra se da su upravo oni omogućili opstanak vrsta (Kovačević, 2000). Zahvaljujući značajnim biološkim aktivnostima sekundarni metaboliti biljaka se koriste vekovima u tradicionalnoj medicini. Mnogi od tih lekova su u upotrebi i danas, a za neke još uvek nije pronađena nijedna sintetička substitucija koja poseduje istu delotvornost i farmakološku specifičnost. U poslednjih 30 godina preko 25% novih lekova koji su farmaceutski odobreni je bazirano na jedinjenjima poreklom iz biljaka, a oko 50% najprodavanijih je nastalo na osnovu poznavanja biljnog sekundarnog metabolizma (Terry i sar., 2006).

Biotehnološka proizvodnja važnih sekundarnih metabolita korišćenjem *in vitro* kultura predstavlja atraktivnu alternativu za proizvodnju ovih jedinjenja. U prvim eksperimentima usled empirijskog odabira visoko-produktivnih stabilnih kultura i nedostatku razumevanja načina sinteze sekundarnih metabolita i regulacije njihove produkcije, upotreba kultura biljnih ćelija ili organa je imala samo ograničen komercijalni uspeh (Verpoorte i sar., 2002). Međutim, sa razvojem molekularne biologije i dubljim razumevanjem biosintetskih puteva prirodnih jedinjenja, *in vitro* kultura biljnih ćelija i organa se brzo razvijala u okviru oblasti regulacije produkcije sekundarnih metabolita (Gaosheng i Jingming, 2012). Ova biotehnološka metoda danas ne predstavlja samo način produkcije određenih jedinjenja, već i moćno oruđe za istraživanje funkcije gena u post-genomskoj eri (Gaosheng i Jingming, 2012).

5.1. *In vitro* kultura *C. creticus* – uspostavljanje, hemijska karakterizacija i značaj

Mikropropagacija ima značajnu ulogu u proizvodnji biljaka koje se koriste za ekstrakciju značajnih hemijskih jedinjenja (Nguyen i sar., 2001; Neumann i sar., 2009; Singh i Tiwari 2010; Zuzarte i sar., 2010). Uspešno uspostavljanje *in vitro* kulture

obično zahteva upotrebu regulatora rastenja najčešće fitohormona iz grupe auksina i citokinina (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996). Vrsta i koncentracija primenjenih auksina ili citokinina, tj. odnos auksina/citokinina može dramatično da utiče ne samo na rasteenje i razviće biljaka (Neumann i sar., 2009), već i na produkciju sekundarnih metabolita u *in vitro* kulturi biljaka (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Karuppusamy, 2009). Primena regulatora rastenja u zavisnosti od koncentracije i vremena aplikacije može dovesti do povećane proizvodnje sekundarnih metabolita, ali često i do smanjenja produkcije ovih jedinjenja (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002).

U literaturi je prikazano svega nekoliko istraživanja *in vitro* propagacije biljka iz roda *Cistus*. Iriondo i saradnici (1995) su u kulturi *Cistus salvifolius* nakon 4 nedelje primenom 0,88 μM BAP dobijali 4,8 pupoljka po eksplantatu, a u kulturi *C. albidus*, *C. laurifolius*, *C. clusii*, *C. ladanifer* oko 2,5 pupoljaka po eksplantatu. Dodatak KIN u podlogu (0,93 μM) doveo je do smanjenja broja obrazovanih pupoljka u kulturi *in vitro* *C. clusii* i *C. ladanifer*. Pela i saradnici (2000) su nakon aplikacije BAP (2,72 mg/l) dobijali oko 3 izdanka *C. creticus* po eksplantatu nakon 5 nedelja. U okviru ove doktorske disertacije uspešno je uspostavljena *in vitro* kultura *C. creticus* na osnovnom MS medijumu bez upotrebe fitohormona. Parametri rastenja i razvića (Tabela 12 i Slika 10) su bili veoma dobri sagledavajući rezultate drugih autora (Pela i sar., 2000; Zygomala i sar., 2003). Ožiljavanje je takođe bilo uspešno, iako u medijum nisu dodavani auksini, što su pokazali i drugi autori (Pela i sar., 2000; Madesis i sar., 2011). Za uspešnu *in vitro* propagaciju *C. creticus* korišćena je tehnika propagacije aksilarnih pupoljaka iz segmenata stabla sa po jednim nodusom koja se pokazala uspešnom i za neke druge vrste (Mišić i sar., 2005a). Nedavno su Madesis i saradnici (2011) putem organogeneze iz kalusa uz primenu kombinacije TDZ i NAA dobijali visok procenat novoobrazovanih izdanaka (33%). Međutim, postojanje faze dezorganizovanog rasta u *in vitro* kulturi kalusa veoma često dovodi do pojave somaklonalnog variranja (Rani i Raina, 2000; Bairu i sar., 2011). Iako somaklonalno variranje može da služi kao izvor novih klonova/varijanti sa željenim boljim osobinama ili za proučavanje evolutivnih procesa (Unai i sar., 2004; Wang i sar., 2007), ova pojava je nepoželjna u kulturi *in vitro* kada se za cilj ima klonsko razmnožavanje biljaka i dobijanje uniformnog biljnog materijala (Bairu i sar., 2011). Upotreba različitih vrsta i koncentracija biljnih regulatora rastenja, posebno citokinina, može dovesti do pojave somaklonalnog variranja kod

različitih biljnih vrsta (Martin i sar., 2006; Jin i sar., 2008; Bairu i sar., 2011). U okviru ove disertacije upotrebom MS medijuma bez dodataka fitohormona dobijen je zdrav i uniforman biljni materijal u kratkom vremenskom roku, čime je omogućena hemijska karakterizacija *in vitro* kultura *C. creticus* u cilju ispitivanja njihove potencijalne dalje upotrebe.

5.1.1. Efekat ugljenih hidrata na rastenje i razviće *C. creticus* u uslovima *in vitro*

Parametri rasteња i razvića ukazuju da je rastenje i ožiljavanje izdanaka *C. creticus* bez obzira na primenjenu vrstu šećera dostizalo svoj optimum na koncentracijama šećera višim od 0,01 M (Slika 20 i Slika 21), što je pokazano i kod nekih drugih biljnih vrsta (Mišić i sar., 2005b; Jo i sar., 2009; Perić i sar., 2012). Ovaj rezultat ukazuje da je biljkama *C. creticus* gajenim na nižim koncentracijama šećera smanjena dostupnost izvora ugljenika koji je neophodan za postizanje punog potencijala za rastenje i razviće. Rastenje i razviće, uključujući i ožiljavanje izdanaka *C. creticus* koji su gajeni na najvišim koncentracijama šećera bilo je inhibirano. U ovim uslovima povećana koncentracija šećera doprinosila je povećanoj dostupnosti ugljenika, ali je dovođila i do povećanja osmotskog potencijala medijuma, koji kao stresogeni faktor može da dovede do inhibicije rasteња biljaka (Jo i sar., 2009). Naime, poznato je da šećeri kao osmotski agensi utiču na usvajanje ostalih komponenti medijuma i tako utiču na *in vitro* kultivaciju (Neto i Otoni, 2003; Nowak i sar., 2004). Pored toga, pri visokim koncentracijama UH u medijumu često dolazi i do usvajanja i nagomilavanja visokih koncentracija samih šećera u biljnim tkivima putem procesa nalik difuziji (Stanzel i sar., 1988; Oliveira i sar., 2002, i tada biljke troše značajnu količinu energije za procese detoksikacije, pa je shodno tome rastenje i razviće usporeno. Parametri rasteња i razvića su bili niži kada su izdanci *C. creticus* gajeni na fruktozi (Slika 20, Slika 21), kao i kod nekih drugih biljnih vrsta (Mišić i sar., 2005b; Perić i sar., 2012), mada postoje podaci da je kod nekih vrsta upravo fruktoza predstavljala najbolji izvor ugljenika (Welander i sar., 1989, Bijelović i sar., 2003). U kulturi *in vitro* nekih drugih biljnih vrsta poput *Alnus cremastogyne* (Tang i sar., 1996), *Prunus mume* (Harada i Murai, 1996) i *Nepeta rtanjensis* (Mišić i sar., 2005b) glukoza je bila bolji izvor ugljenika. Važno je napomenuti i da su procesi usvajanja i fosforilacije glukoze i fruktoze u biljnim ćelijama

različito regulisani, kao i da biljne ćelije na drugačiji način reguju na različite vrste šećera (Krook i sar., 2000; Kretzschmar i sar., 2007). Osim toga, smatra se da fruktoza dovodi do sniženja pH medijuma nakon autoklaviranja u mnogo većem stepenu od drugih šećera, pri čemu se u medijumu mogu detektovati i toksična jedinjenja poput furfurala i hidrosimetilfurfurala (Ribaux i sar., 1995; Uosukainen i Vasara, 1995), čime se može objasniti slabije rastenje i razviće izdanaka *C. creticus* na medijumu sa dodatkom ove heksoze.

5.1.2. Hemijska karakterizacija *in vitro* kulture *C. creticus*

Teorijski, svaka *in vitro* kultura bi trebalo da produkuje iste sastojke kao i biljka iz koje potiče. Praktično se ovo ne dešava uvek, najčešće zato što je produkcija pojedinih sekundarnih metabolita vezana za specijalizovane ćelije ili ćelije u određenoj fazi razvoja (Kovačević, 2000), pri čemu komunikacija između organa (uključujući transport perekursora ili regulatora rasteња iz korena u list i obratno) takođe ima veoma važnu ulogu. Dediferencirane kulture (kulture kalusa i ćelijska suspenzija) najčešće produkuju znatno manje sekundarnih metabolita u odnosu na organizovane kulture koje predstavljaju i znatno stabilnije produkcijske sisteme. Tako kultura izdanaka i korenova, kao i kultura transformisanih korenova predstavljaju ponekad produkcijski sposobnije sisteme u odnosu na materijal iz kog su dobijene (Kovačević, 2000).

Iako postoje, doduše veoma oskudni, podaci o *in vitro* kulturi biljaka iz roda *Cistus* (Iriondo i sar., 1995; Pela i sar., 2000; Zygomala i sar., 2003; Madesis i sar., 2011) do sada nema literaturnih podataka o fitohemijskoj analizi biljaka dobijenih ovom metodom. Prve analize hemijskog sastava *in vitro* biljaka *C. creticus* su objavljene kao rezultat rada na ovoj tezi (Skorić i sar., 2012). Biljke gajene *in vitro* su fitohemijski okarakterisane korišćenjem serije različitih analitičkih metoda kao što su GC-MS, CG-FID, PTR-MS, Headspace-GC-MS i UHPLC/LTQ OrbiTrap MS analiza. GC-MS analiza četiri klona *C. creticus* je pokazala da biljke iz *in vitro* kulture karakteriše visok sadržaj diterpena, pretežno labdanskog tipa (Tabela 15 i Slika 13), što je karakteristično i za etarska ulja i smolu ovih biljaka iz prirode (Demetzos i sar., 1999; 2002). Hemijska analiza ukupnih trihoma sa listova *C. creticus* prikupljenih u različitim fazama razvoja listova je pokazala da mladi listovi (1-2 cm dužine) imaju najveći sadržaj LD, koji se

smanjuje u starijima listovima (Falara i sar., 2008). Glavna komponenta etanolnog ekstrakta izdanaka *C. creticus* gajenih *in vitro* je labd-7,13-dien-15-ol acetat. Uzimajući u obzir činjenicu da su listovi iz *in vitro* kulture bili iz iste razvojne faze, naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koji pokazuju da je ovo jedinjenje najzastupljenije upravo u mladim listovima biljaka iz prirode (Falara i sar., 2010). Procentualna zastupljenost LD je slabo varirala među testiranim klonovima. Međutim, prema interpopulacionom istraživanju etarskih ulja *C. creticus* (Demetzos i sar., 2002) sadržaj ovih jedinjenja je veoma varirao između 25 populacija. Pored uticaja razvojne faze listova na sadržaj LD (Falara i sar., 2008; 2010), do varijacija u sadržaju dovode i promene parametara životne sredine poput osvetljenosti, klime, nutritijenata, dostupnosti vode, i dr. (Robles i Garzino, 2000; Demetzos i sar., 2002), koji su u kulturi *in vitro* bili konstantni.

Prisustvo ostalih klasa terpena (monoterpena i seskviterpena) u izdancima vrste *C. creticus* gajenim *in vitro* je bilo značajno manje u odnosu na diterpene (labdanskog tipa). Međutim, rezultati GC-MS analize uz korišćenje *headspace* tehnike ukazali su da su monoterpeni i seskviterpeni bili najzastupljeniji (Tabela 13, Tabela 14, Slika 11). Ove grupe jedinjenja spadaju u grupu isparljivih organskih jedinjenja (VOC, eng. *volatile organic compounds*). Uzimajući u obzir da su VOC važne komponente hemijskog fenotipa biljaka (Maffei i sar., 2011), određivanje emisije VOC iz različitih biljnih vrsta može imati veliki značaj i u potencijalnoj produkciji biološki aktivnih jedinjenja za farmaceutsku industriju (Maes i sar., 2001). Danas je sve više dokaza da VOC poseduju niz bioloških aktivnosti, te da predstavljaju značajan, a još uvek u velikoj meri neiskorišćen izvor novih lekova i prekursora lekova (Maffei i sar., 2011). Među razvijenim sistemima za prikupljanje i praćenje VOC, *headspace* tehnike prikupljanja se izvode u kombinaciji sa GC-MS analizom što je omogućilo i dovelo do dobijanja mnogo tačnijih i pouzdanijih profila biljnih VOC (Rapparini i sar., 2001; Tholl i sar., 2006). Relativno novije metodologije poput PTR-MS, omogućavaju istovremenu analizu VOC u realnom vremenu sa veoma visokom osetljivošću (Lindinger i sar., 1998; Warneke et al 2003, Steeghs i sar., 2004). Smatra se da će buduća upotreba PTR-MS za dobijanje detaljnijih profila VOC tokom razvoja biljke obezbediti veliku korist u tehnologiji *in vitro* kulture (Predieri i Rapparini, 2007). U okviru ove disertacije po prvi put je okarakterisan VOC profil *Cistus creticus* u

posudama za *in vitro* gajenje, pri čemu je detektovan visok sadržaj monoterpena poput α -pinena (Skorić i sar., 2013b).

Odsustvo trihoma kod *in vitro* gajenih kultura ćelija i tkiva (npr. kalus, suspenzija ćelija) predstavlja jedan od razloga za izostanak vidljive akumulacije određenih sekundarnih metabolita u kulturi *in vitro*, mada uticaj imaju i procesi degradacije ovih jedinjenja (Falk i sar., 1990). Generalno biosinteza i akumulacija brojnih sekundarnih metabolita se odigrava u trihomama. Tako se sinteza karakterističnih monoterpena odigrava u trihomama biljke *Mentha piperita* (Lange i sar., 2000), dok se u trihomama nekoliko vrsta *Solanaceae* proizvode jedinjenja poput seskviterpena, metil-ketona i diterpena (Antonious i Kochhar, 2003). U peltatnim trihomama biljke *Salvia divinorum* akumuliraju se karakteristični diterpeni, u peltatnim trihomama bosiljka akumuliraju se fenipropenoidi, dok npr. kapitatne glandularne trihome lucerke proizvode flavonoide i njihove derivate (Gang i sar., 2001; Aziz i sar., 2005; Siebert, 2004).

Trihome su od značaja u taksonomskim istraživanjima roda *Cistus*. Pored toga, prema dosadašnjim istraživanjima, glandularne trihome su pretpostavljeno mesto biosinteze i akumulacije LD kod *C. creticus* (Falara i sar., 2008; 2010). Do sada ne postoje literaturni podaci o postojanju žlezdanih struktura kod vrsta roda *Cistus* u uslovima *in vitro*. Na listovima *in vitro* gajenih klonova *C. creticus* skenirajućom elektronskom mikroskopijom ustanovljeno je prisustvo velikog broja trihoma kako glandularnih, tako i neglandularnih (Slika 15). Stelatne trihome *C. creticus* su imale 6 - 12 krakova, kao što je detektovano i u istraživanjima Gülz i sar. (1996) i Falara i sar. (2008). Gülz i saradnici su ovaj podatak iskoristili i za jasno razdvajanje *C. creticus* (sin. *C. incanus* subsp. *creticus*) od nekih drugih podvrsta *Cistus incanus*. Dosadašnje hemijske analize smole i ekstrakta listova *C. creticus* su ukazale na prisustvo terpena i polifenolnih jedinjenja (Demetzos i sar., 1999; 2002), što zajedno sa podatkom o sadržaju istih sekundarnih metabolita i u izolatu svih trihoma (Falara i sar., 2008) ukazuje da su ove žlezdane dlake mesta biosinteze odgovarajućih jedinjenja. Do sada nije pokazano u kojem tipu trihoma se ova jedinjenja proizvode i/ili luče. Histo-hemijskom analizom trihoma *C. creticus* koja je urađena u okviru ove disertacije, jasno je utvrđeno da je sekretorni materijal tipa II glandularnih trihoma smola koja sadrži terpena i fenolna jedinjenja (Slika 16 - 18). Listovi ostalih vrsta roda *Cistus* kao što su *C.*

symphytifolius, *C. monspeliensis*, *C. laurifolius*, *C. ladonifer*, *C. palhinhae* takođe luče smolu u većoj ili manjoj količini, pri čemu se sastav ove smole razlikuje među vrstama (Gülz i sar., 1996; Paolini i sar., 2009; Barrajon-Catalán i sar., 2010). Ovaj smolasti sloj koji pokriva površinu epidermisa može imati ulogu u refleksiji svetlosti i na taj način u prevenciji prekomernog gubitka vode. Takođe, pokazano je da ovakav smolasti lepljivi sloj može da predstavlja i fizičku zamku za insekte i na taj način štiti biljku od herbivora (Siebert, 2004). Generalno, terpeni i fenolna jedinjenja su često uključeni u hemijsku odbranu biljaka, jer je poznata njihova antifungalna, antibakterijska i antifidantna aktivnost (Harborne, 1997; Nishida, 2002). Uočeno preliivanje sekretornog materijala u vidu kapljica kroz kutikulu iz kapitatnih trihoma tipa II je već opisano kod kapitatnih trihoma tipa II vrste *Salvia aurea* (Serrato-Valenti i sar., 1997), trihoma sa dugačkom drškom kod *Salvia blepharophylla* (Bisio i sar., 1999) i trihoma tipa Cx kod *Sideritis italica* (Giuliani i sar., 2011).

Hemijska analiza samih kapljica eksudata kapitatnih trihoma tipa II biljaka *C. creticus* je prvi put urađena u okviru ove disertacije. Pokazano je da su labdanski diterpeni najdominantnija prisutna jedinjenja (Tabela 16). Monoterpeni i seskviterpeni su prisutni u manjoj količini, koji se kada trihome puknu oslobađaju i brzo isparavaju sa površine listova (Vivanco i Baluška, 2012). Za razliku od njih određene vrste diterpena, poput labdanskih diterpena *C. creticus* i neoklerodan diterpena *Salvia divinorum*, nisu isparljivi i ostaju na površini listova (Vivanco i Baluška, 2012). U prilog ovom objašnjenju idu i već pomenuti rezultati hemijske analize atmosfere posuda iz kulture *in vitro* gde su monoterpeni i seskviterpeni bili najzastupljeniji (Tabela 14).

Druga velika grupa sekundarnih metabolita koja je detektovana u etanolnim ekstraktima izdanaka *C. creticus* gejenih *in vitro* su fenolna jedinjenja i flavonoidi. Analiza polifenolnih jedinjenja u okviru vrsta roda *Cistus* ukazala je na prisustvo galne kiseline (Santagati i sar., 2008; Barrajon-Catalán i sar., 2010), katehina, galokatehina i njihovih derivata (Barrajon-Catalán i sar., 2010; Tomás-Menor i sar., 2013), apigenina i kamferol derivata (Chaves i sar., 1997; Ramalho i sar., 1999; Saracini i sar., 2005), kao i kvercetina, miricetina i njihovih glikozida (Saracini i sar., 2005) itd. Vrsta i broj fenolnih jedinjenja su se razlikovali ne samo među vrstama roda *Cistus*, već i u zavisnosti od primenjenih rastvarača za ekstrakciju, i analitičkih metoda, a istraživanja

polifenolnih jedinjenja su korišćena i za potrebe sistematike (Barrajón-Catalán i sar., 2011). Spektrofotometrijski određen ukupan sadržaj fenola i flavonoida u izdancima *C. creticus* gajenim *in vitro* nije ukazao na razlike među klonovima (Slika 44), a UHPLC/LTQ - OrbiTrap MS analizom su identifikovana karakteristična fenolna jedinjenja kao što su hininska kiselina, galokatehin i katehin (Slika 45 i Tabela 19). Hininska kiselina je detektovana u svega nekoliko vrsta roda *Cistus*, pri čemu je značajno zastupljena kod *C. albidus* i *C. salviifolius* (Tomás-Menor i sar., 2013). Galokatehin je prisutan kod vrsta roda *Cistus* (Santagati i sar., 2008; Barrajón-Catalán i sar., 2011), među kojima i *C. incanus* subsp. *incanus* (Santagati i sar., 2008; Barrajón-Catalán i sar., 2011), kod kog je detektovano i prisustvo katehina. Prisustvo kvercetina i miricitina, kao i njihovih glikolizovanih derivata je takođe često detektovano i kod drugih vrsta roda *Cistus* (Saracini i sar., 2005; Barrajón-Catalán i sar., 2011; Tomás-Menor i sar., 2013).

U korenovima *C. creticus* gajenim *in vitro* među polifenolnim jedinjenjima identifikovani su jedinjenja kao što su npr. hininska kiselina, katehin i njegov dimer, pri čemu nisu detektovana određena jedinjenja prisutna u izdanku. Prema našim saznanjima ovo je prvi put da je urađena hemijska analiza korena *Cistus creticus* (Skorić i sar., 2012). Pored UHPLC/LTQ - OrbiTrap MS analize urađene su i GC-FID i GC-MS analize etanolnog ekstrakta korena iz *in vitro* kulture, pri čemu nije detektovano prisustvo labdanskih diterpena karakterističnih za nadzemni deo biljke. Ovo je u saglasnosti sa nalazima da organi bez trihoma poput korenova i semena, imaju smanjenu ekspresiju gena biosintetskog puta terpena (Pateraki i Kanellis, 2008; Falara i sar., 2010). Analiza ekspresije nekoliko gena biosintetskog puta ovih jedinjenja u samim *in vitro* kulturama korenova takođe je ukazala na smanjenje njihove ekspresije (Slika 42).

Hininska kiselina je detektovana i u biljkama poput *Vaccinium macrocarpon*, *V. oxycoccos*, *V. vitis-idaea*, *Uncaria tomentosa*, *Aster* spp, kao i u hrani biljnog porekla (Van Gorsel i sar., 1992; Beveridge i sar., 1999; Åkesson i sar., 2005). Ponekad je kao u ekstraktu mačje šape (*Uncaria tomentosa*) detekcija hininske kiseline uspešno izvršena tek sa napretkom analitičkih metoda (Åkesson i sar., 2005). Pero i saradnici (2009) su nedavno pokazali izuzetnu *in vivo* delotvornost hininske kiseline kao antioksidansa kada se koristi u ishrani ljudi. Takođe hininska kiselina predstavlja odličan početni materijal

za sintezu novih farmaceutskih jedinjenja (González i sar., 2003). Uzimajući sve navedeno u obzir, *in vitro* kultura izdanaka i korenova može predstavljati adekvatan ovog jedinjenja.

5.1.3. Genetička transformacija *C. creticus*

Jedan od pristupa za povećanje produkcije sekundarnih metabolita u kulturi tkiva i organa je transformacija željene biljne vrste pomoću prirodnog vektorskog sistema *Agrobacterium rhizogenes* (Srivastava i Srivastava, 2007). Brojne biljne vrste su genetički transformisane sa *A. rhizogenes* i uspešno je uspostavljena kultura transformisanih korenova (Bulgakov, 2008; Ono i Tian 2011). Kulture transformisanih korenova često proizvode i akumuliraju značajne sekundarne metabolite karakteristične za koren iz prirode (Kim i sar., 2002), za nadzemni deo biljke (Weathers i sar., 1994; Bakkali i sar., 1997), pa čak i jedinjenja koja nisu prisutna u datoj biljci (Veerasham, 2004). Jedna od glavnih prednosti kulture transformisanih korenova je što oni često pokazuju isti ili veći kapacitet biosinteze sekundarnih metabolita kao i majka biljka (Kim i sar., 2002; Srivastava i Srivastava, 2007), a karakteriše ih i genetička stabilnost i veliki prirast biomase (Ono i Tian, 2011). Smatra se da različiti nivoi ekspresije *rol* gena mogu promeniti odnos endogenih regulatora rastanja (auksina i citokinina) što se odražava na rastenje i razviće transformisanih korenova (Shen i sar., 1988; Ono i Thian, 2011). Takođe insercija *rol* gena može doći i do povećane produkcije sekundarnih metabolita (Bulgakov, 2008). Transformisani korenovi su često sposobni da regenerišu vijabilnu biljku čija se genetička stabilnost održava kroz subkulture (Srivastava i Srivastava, 2007), a koja takođe može proizvoditi željene sekundarne metabolite u većoj količini (Giri i Narasu, 2000; Kim i sar., 2002; Ono i Thian, 2011).

U zavisnosti od primenjenog bakterijskog soja *A. rhizogenes* varira i odgovor same biljke, pri čemu uticaj ima i interakcija samog bakterijskog soja sa biljnim tkivom (Sinkar i sar., 1988; Christey, 2001; Veena i Taylor, 2007). U literaturi ne postoje podaci o transformaciji *C. creticus*, ali se može naći nekoliko citata vezana za transformaciju *C. incanus* (Wenkart i sar., 2001; Coughlan i Piché, 2005; Zaretsky i sar., 2006) koji se prvenstveno bave proučavanjem mikorize. U okviru ove doktorske

disertacije upotrebljen je bakterijski soj agropinskog tipa *A. rhizogenes* A4M70GUS, koji se je u okviru naše laboratorije već uspješno korišćen za transformaciju *Blackstonia perfoliata* (Bijelović i sar., 2004), *Aesculus hippocastanum* (Zdravković-Korać i sar., 2004), *Hypericum perforatum* (Vinterhalter i sar., 2006), *Centaurium erythrea* (Subotić i sar., 2003), *Chenopodium rubrum* (Dmitrović i sar., 2010), *Centaurium maritimum* (Mišić i sar., 2013), kao i nekoliko vrsta roda *Gentiana* (Momčilović i sar., 1997).

Inokulacija sa *A. rhizogenes* A4M70GUS je kod *C. creticus* dovela do pojave transformisanih korenova sa veoma visokom efikasnošću transformacije (Slika 37). U ovom radu je prvobitna selekcija transformisanih korenova urađena na osnovu brzog rasta adventivnih korenova na čvrstom MS medijumu bez prisustva biljnih hormona (Tepfer i Casse–Delbart, 1987), a zatim su potencijalno transformisani korenovi podvrgnuti GUS histohemijskom bojenju. Intenzitet i distribucija plave boje su varirali između različitih klonova *C. creticus* (Slika 39A). Variranje intenziteta i distribucije boje između različitih transformisanih klonova, pa čak i u okviru istog klona uočeno je od strane nekoliko autora (Momčilović i sar., 1997; Zdravković Korać i sar., 2004; Tiwari i sar., 2007). Faktori koji mogu da utiču na ekspresiju reporter gena su mesto integracije, broj kopija, kao i proces utišavanja gena (van Leeuwen i sar., 2001), što ukazuje da postoji mogućnost da transformisano tkivo ne reaguje sa X–Gluc–om. Tako utišavanje *uidA* gena na transkripcionom nivou metilacijom *de novo* (Park i sar., 1996) ili post–transkripcionom nivou degradacijom specifične iRNK (Agrawal i sar., 2003) dovodi do izostanka sinteze β -glukuronidaze, a samim tim i negativne X–Gluc reakcije. U okviru ove disertacije svi nebojeni klonovi su smatrani netransformisanim i nisu dalje testirani. U odabranim klonovima koji su pokazali pozitivnu reakciju sa X–Gluc–om kao pouzdan dokaz transformisanosti tkiva urađena je i PCR analiza čime je potvrđeno je prisustvo *uidA* gena u njima (Slika 39D).

Genetička transformacija pomoću *A. rhizogenes* dovodi do formiranja *hairy root* fenotipa korena pri čemu je karakterističan veliki broj korenskih dlačica. Korenske dlačice pojedini autori klasifikuju kao trihome na korenovima (Werker, 2000) i smatraju da je njihov razvoj pod istom genetskom kontrolom kao i trihoma na listovima (Kellogg, 2001). Zapravo, procesi nastanka trihoma (dlačice na listovima) i korenskih dlačica uključuju sličan skup gena, međutim mehanizam nastanka se razlikuje

(Schellmann i sar., 2002). Korenske dlačice nastaju od ćelija epidermisa i strukturno su manje raznolike od pravih trihoma (Grierson i Schiefelbein, 2002). Funkcije korenskih dlačica su obično povezane sa povećanjem površine korena, pa time i unosa vode i nutritijenata (Gilroy i Jones , 2000). Pojedine biljne vrste su razvile specijalizovane korenske dlačice koje proizvode i izlučuju biološki aktivne sekundarne metabolite. Tako npr. korenske dlačice *Sorghum* spp. luče velike količine uljanog eksudata (Hess i sar., 1992; Nimbale i sar., 1996; Czarnota i sar., 2003). Zapravo pokazano je da korenske dlačice vrsta *Sorghum* imaju enzime neophodne za biosintezu rezorcinola i benzokvinona, pri čemu su autori pokazali da ove korenske dlačice mogu funkcionisati kao specijalizovane ćelije za proizvodnju sekundarnih metabolita (Dayan i sar., 2007). Na osnovu ovih literaturnih podataka urađena je hemijska analiza sastava etanolnih ekstrakata transformisanih korenova *C. creticus*, kao i analiza ekspresije odgovarajućih gena uključenih u biosintezu terpena. Rezultati su ukazali na veoma nizak nivo ekspresije gena MVA i MEP biosintetskog puta u transformisanim korenovima u poređenju sa ekspresijom istih u izdancima (Slika 42). Nivoi ekspresije ovih gena su bili slični nivoima ekspresije u netransformisanim korenovima, ili u nekim drugim organima koji ne poseduju trihome (Pateraki i Kanellis, 2008; Falara i sar., 2010). U skladu sa ovim rezultatima prisustvo LD nije detektovano u transformisanim korenovima. Sadržaj fenolnih jedinjenja i flavonoida u određenim klonovima transformisanih korenova je bio povećan (Slika 44). Važno je istaći da transformisani korenovi najčešće imaju veoma veliki prirast biomase (Tiwari i sar., 2007, Ono i Tian, 2011), koji ponekad može iznositi i 90 puta više u odnosu na prirast kulture netransformisanih korenova (Dmitrović i sar., 2010). Intenzitet rasta kontrolnih, netransformisanih korenova *C. creticus* je bio veoma slab, dok je uvećanje sveže mase transformisanih korenova u odnosu na početnu masu iznosio 10 do 12 puta (Slika 40). Stoga su kulture transformisanih korenova, posmatrano kao produkcionni sistemi, mnogo značajniji od kulture netransformisanih korenova.

Gajenje transformisanih korenova na medijumu sa odgovarajućim regulatorima rastanja ili u određenim uslovima najčešće dovodi do regeneracije izdanaka i formiranja transformisanih biljaka sa izmenjenom, poželjno povećanom produkcijom određenih sekundarnih metabolita (Saito i sar., 1992; Bourgaud i sar., 2001). Regeneracija transformisanih biljaka kod nekih vrsta se može javiti spontano (Vinterhalter i sar.,

1999; Subotić i sar., 2003), ali kod nekih biljnih vrsta postoje problemi i teškoće u dobijanju transformisanih biljaka iz *hairy root* kultura (Dmitrović i sar., 2010). U okviru eksperimenata sa transformisanim korenovima *C. creticus* regeneracija transformisanih biljaka je bila neuspješna iako je primenjen veliki broj različitih i preporučenih protokola. Ipak, iako nije bilo moguće dobiti transformisane biljke, uspešno je uspostavljena kultura kalusa poreklom iz transformisanih korenova *C. creticus*. U literaturi postoje podaci da kulture kalusa ili ćelijskih suspenzija određenih biljnih vrsta iako dediferencirane produkuju sekundarne metabolite karakteristične za nadzemne delove biljke (Zenk, 1991). Uzimajući ove podatke u obzir urađena je analiza hemijskog sastava etanolnog ekstrakta kalusa, kao i analiza ekspresije gena koji učestvuju u biosintetskom putu labdanskih diterpena. Rezultati su međutim ukazali da se labdanski diterpeni ne produkuju u kalusima *C. creticus*, pri čemu je i ekspresija specifičnih gena uključenih u MEP biosintetski put bila na niskom nivou (Slika 42).

Uzevši u obzir da je uspešnost transformacije *C. creticus* pomoću A4M70GUS *A. rhizogenes* veoma visoka (95%), a sam protokol transformacije brz i jednostavan, rezultati ove disertacije mogu imati i dalju primenu u cilju produkcije željenih sekundarnih metabolita poput fenolnih jedinjenja, ali i labdanskih diterpena. Napredak i razvijanje tehnika molekularne biologije koje danas omogućavaju insercije željenih gena u vektor sisteme *A. rhizogenes* omogućile su, u okviru rada ove laboratorije, uspešno ugrađivanje gena koji učestvuju u biosintezi seskviterpena u binarni vektorski konstrukt *A. rhizogenes* koji je upotrebljen za uspešnu transformaciju *Cichorium intybus* (Bogdanović i sar., 2013). Sličan scenario razvoja vektorskih sistema koji nose gene odgovorne za biosintezu labdanskih diterpena i njihova potencijalna povećana ekspresija u transformisanim brzorastućim korenovima *C. creticus*, mogao bi otvoriti čitav spektar daljih istraživanja u cilju dobijanja labdanskih diterpena u kulturi *in vitro*.

5.2. Regulacija produkcije labdanskih diterpena u uslovima *in vitro*

Svaki tip *in vitro* kulture biljnog tkiva predstavlja složeni sistem u kome se neprestano odvijaju procesi ćelijske deobe, diferencijacija ćelija, kao i razvojni (organo- i morfogogenetski) procesi (Gaspar i sar., 2002). Biljke, ili eksplantati biljaka, gajene u

kulturi *in vitro* su pri tome kontinuirano izložene specifičnim uslovima koji se veoma razlikuju u odnosu na uslove u prirodnoj sredini (Gaspar i sar., 2002). Ovi specifični uslovi uključuju mehaničke povrede i oštećenje tkiva tokom same manipulacije, povećan osmolaritet hranljivog medijuma usled prisustva saharoze u podlozi, neobičajene hormonske tretmane, kao i visoku relativnu vlažnost u posudama za gajenje biljaka (Gaspar i sar., 2002). Međutim, mogućnost precizne kontrole brojnih parametra (poput temperature, intenziteta svetlosti i vlažnosti, sadržaja hranjive podloge), kao i njihovo održavanje na konstantnom nivou tokom trajanja i ponavljanja eksperimenata, predstavlja veliku i značajnu prednost korišćenja metoda *in vitro* kulture.

Biljke kao deo odbrambenog mehanizma sintetišu i koriste terpene pored ostalih sekundarnih metabolita kako bi zaštitili biljne ćelije od različitih vrsta stresa (Munné Bosh i Alegre, 2003). Byun-McKay i saradnici (2006) su tako pokazali da dolazi do akumulacije terpena nakon povređivanja usled povećane transkripcije gena koji učestvuju u biosintetskim putevima ovih metabolita. Upotreba stersogenih faktora u cilju povećanja ili indukcije *de novo* sinteze sekundarnih metabolita se široko koristi u *in vitro* kulturama biljnih ćelija, tkiva i organa (Sudha i Ravishankar, 2003; Karuppusamy, 2009; Ramakrishna i Ravishankar, 2011). Stoga analiza regulacije ekspresije gena koji učestvuju u biosintetskom putu LD, kao i produkcije ovih jedinjenja u uslovima abiotskog stresa može doprineti iznalaženju načina za njihovu kontrolisanu povećanu produkciju.

5.2.1. Efekat procesa dehidracije /rehidracije na regulaciju produkcije labdanskih diterpena u izdancima *C. creticus* gajenih *in vitro*

U eksperimentalnom radu tokom ispitivanja procesa dehidracije i rehidracije u uslovima *in vitro* upotrebljene su specijalno adaptirane posude sa čeličnim nosačima (Slika 7). Ovako modifikovani sistem olakšao je manipulaciju sa biljnim eksplantatima, pri čemu je na minimum svedena mogućnost oštećenja biljnog materijala tokom rada. Takođe, upotrebom specifičnih hranljivih podloga koje nisu sadržale saharozu, izbegnuta je mogućnost da povišen osmotski pritisak utiče na eksperimentalne uslove i rezultate

(van der Weele i sar., 2000; Verslues i sar., 2006). Na ovaj način je izbegnut i potencijalni efekat saharoze na praćenje efekta procesa dehidracije/rehidracije (Finkelstein i sar., 2002; Verslues i sar., 2006).

Za regulisanje vodnog potencijala podloge prilikom ispitivanja efekta vodnog deficita u uslovima *in vitro* koriste se osmotski aktivna jedinjenja. Na ovaj način može se precizno kontrolisati vrednost ψ_w podloge, obezbeđene su mogućnosti za pouzdano ponavljanje eksperimentalnih uslova, kao i izvođenja velikog broja eksperimenata u kratkom vremenskom roku (Verslues i sar., 2006). U datim eksperimentima izbor osmotski aktivnih jedinjenja je veoma važan. Naime, tokom procesa dehidracije *in vivo*, sa snižavanjem ψ_w zemljišta dolazi do smanjivanja sadržaja vode u ćelijskim zidovima i protoplastu biljnih ćelija i njihovog postepenog skupljanja (Oertly, 1985; Verslues i sar., 2006; Taiz i Zeiger, 2010). Međutim, rastvori osmotski aktivnih jedinjenja male molekulske mase koji se često koriste za snižavanje ψ_w podloge u uslovima *in vitro*, dovode do drugačijih efekata na biljne ćelije. Zapravo ova osmotski aktivna jedinjenja male molekulske mase, poput manitola, slobodno prolaze kroz pore ćelijskog zida i dovode do plazmolize, odnosno do gubitka vode iz protoplasta ćelija i smanjenje njegove zapremine, dok zapremina ćelijskog zida ostaje neizmenjena (Verslues i sar., 2006). Uzimajući u obzir da plazmoliza može dovesti do oštećenja ćelija i ne predstavlja deo tipičnog odgovora biljaka na vodni stres preporučuje se njeno izbegavanje tokom ispitivanja (Munns, 2002; Verslues i sar., 2006). Takođe, biljne ćelije mogu da usvajaju manitol, pri čemu ovo jedinjenje izaziva specifične nepovoljne efekte na proces rastanja biljaka (Hohl i Schopfer, 1991; Verslues i sar. 2006). Osmotski aktivna jedinjenja velike molekulske mase, kao što je PEG molekulske mase 6000 ili više, ne mogu da prođu kroz pore ćelijskog zida (Carpita i sar., 1979; Oertly, 1985). Stoga se PEG preporučuje kao najbolji izbor za snižavanje ψ_w prilikom ispitivanje efekta vodnog stresa na biljke (van der Weele i sar., 2000; Verslues i Bray, 2004; Verslues i sar. 2006). Dodatak PEG-a u medijum za *in vitro* gajenje *C. creticus* doveo je do smanjenja relativnog sadržaja vode u listovima već nakon jednog dana (Slika 22). Smatra se da u trenutku kada relativni sadržaj vode u tkivu iznosi 30 - 40%, a kod biljaka osetljivih na isušivanje padne ispod 70%, dolazi do značajnog poremećaja u fotosintetskoj aktivnosti najverovatnije zbog procesa koji dovode do kristalizacije enzima (Kaiser, 1987), pri čemu je za ponovno uspostavljanje fotosintetske aktivnosti

nakon rehidracije potrebno nekoliko sati (Bewley i Krochko, 1982; Augusti i sar., 2001). Relativni sadržaj vode u izdancima *C. creticus* koji su nakon procesa dehidracije uključeni u proces rehidracije se vratio na normalnu vrednost već nakon jednog dana (Slika 22). Kada je vodni potencijal iznosio -2 MPa tokom procesa rehidracije se uspostavljala i normalna morfologija listova tj. nekrotične promene nisu bile uočljive, kao i uvenuće koje predstavlja karakterističnu manifestacija dehidratiranih listova (Slika 23). Stoga je eksperimentalna postavka korišćenjem ovih uslova omogućila dalja istraživanja.

Većina proučenih mehanizama tolerancije na uslove vodnog deficita primarno funkcionišu kako bi zaštitili ćelijske strukture od efekata dehidracije (Verslues i sar., 2006). Nekoliko tipova zaštitnih proteina od kojih su najznačajniji dehidrini (grupa LEA proteina) se akumuliraju tokom odgovora na dehidraciju (Close, 1997; Rorat, 2006). Dehidrini imaju širok opseg molekulske mase od 9 - 200 kDa (Hanin i sar., 2011), pri čemu dehidrini iste veličine u različitim vrstama biljaka mogu imati različite funkcije (Rorat, 2006). Tokom delovanja različitih faktora stresa koji dovode do dehidracije ćelija (suša, salinitet, osmotski stres, hladnoća, i sl.), dehidrini se akumuliraju u visokim količinama u svim vegetativnim tkivima (Skiver i Mundy, 1990, Bray, 1997), pri čemu različiti faktori dovode do akumulacije dehidrina različitih veličina (Rorat, 2006). Dehidrine, iako imunološki veoma raznovrsnu familiju, karakteriše „K“ segment tj. aminokiselinska sekvenca (EKKGIMDKIKELPG) blizu karboksi termina (Close i sar., 1993). Pomoću antitela pripremljenih prema ovoj K sekvenci dehidrini su identifikovani u velikom broju različitih biljaka (Close i sar., 1993; Campbell i Close, 1997). U okviru rada na ovoj disertaciji po prvi put su detektovani dehidrini u biljkama *C. creticus* (Dević i sar., 2009). Sa porastom vodnog stresa u izdancima gajenim *in vitro* dolazilo je do akumulacije dve forme dehidrina od 63 kDa i 66 kDa. Sa procesom rehidracije akumulacija dehidrina se smanjivala, dok u kontrolnim uzorcima dehidrini nisu detektovani (Slika 25). Sličan obrazac akumulacije dehidrina tokom procesa dehidracije/rehidracije uočen je kod mnogih biljaka poput kukuruza i *Cynodon* spp. (Close i sar., 1993; Lopez i sar., 2003; Mohammadkhani and Heidari, 2008; Hu i sar., 2010, Hassan i sar., 2013). Ovakav obrazac akumulacije dehidrina je iskorišćen kao pokazatelj vodnog stresa u biljkama *C. creticus* koje su ispitivane u okviru ove disertacije.

Ograničena dostupnost vode najčešće utiče negativno na rastenje i razviće biljaka, dok umereni vodni deficit može imati povoljan efekat na akumulaciju biološki aktivnih jedinjenja u lekovitim i aromatičnim biljkama (Gershenzon, 1984; Palevitch, 1987; Marchese i sar., 2010). Biosintetski putevi terpenskih jedinjenja spadaju u metaboličke puteve na koje utiče nedostatak vode u biljkama (Liu i sar., 2005; Munné-Bosch i sar., 2009; Pateraki i Kanelis 2010). Prema Gershenzon (1984) u zeljastim i žbunastim biljkama pri umerenom vodnom deficitu raste sadržaj terpena. Značajan porast u sadržaju artemizina pri umerenom vodnom deficitu može se pripisati činjenici da je rastenje smanjeno, dok se fotosinteza još uvek obavlja (Marchese i sar., 2010). Međutim, smanjenje produkcije seskviterpena artemizina je uočeno u listovima *Artemisia annua* koji su bili izloženi suši duži period (Yadav i sar., 2014). Niži nivoi sinteze diterpena su uočeni u listovima biljke *Abies grande* koja je bila izložena suši (Levinsohn i sar., 1993). U biljkama *Salvia officinalis* produkcija ditrepena abietanskog tipa (karnozična kiselina) je smanjena tokom suše, dok se povećava produkcija oksidativnih produkata ovih jedinjenja (Munné-Bosch i sar., 2001). Slični rezultati su dobijeni i u eksperimentima sa *Rosmarinus officinalis* (Munné-Bosch i Alegra, 2000). Nivo α -tokoferola se u uslovima suše progresivno smanjuje u biljkama *S. officinalis* (Munné-Bosch i sar., 2001), dok se sinteza ovog jedinjenja povećava u nekim drugim biljkama među kojima je i *C. creticus* (Munné-Bosch i sar., 2009). Za sada u literaturi ne postoje podaci o promeni količine diterpena labdanskog tipa u uslovima vodnog deficita. Naime, dosadašnja ispitivanja ekspresije gena koji učestvuju u biosintezi LD *C. creticus* koje su urađena od strane Kanellisa i saradnika (Falara i sar., 2008; Pateraki i Kanellis, 2010) pratila su promene određenih gena pomoću RT-PCR metode tokom 5 dana suše bez analize količine LD u ovim biljkama. Iako su autori nakon 1 dana detektovali veoma blago povećanje ekspresije *HMGR* i *DXS* gena, nakon 3 dana i kasnije nakon 5 dana došlo je do smanjenja njihove ekspresije (Pateraki i Kanellis, 2010). Ekspresija gena *GGPPSI* se nije menjala tokom eksperimenta, dok je ekspresija gena *DXR*, iako u početku nepromenjena, opala nakon tri dana. Na osnovu naših rezultata jasno se uočava da je do statistički značajnog smanjenja ekspresije *HMGR* i *DXS* gena dolazilo tek nakon dva dana, dok je izrazito smanjenje ekspresije ostalih gena (*DXR*, *GGPPSI* i *CLS*) detektovano već nakon 6h (Slika 32). Smanjenje ekspresije gena biosintetskog puta terpena je nedavno uočeno i za *DXS* i *IPI* gen kod *Solanum chilense* i

S. lycopersicum (Loyola i sar., 2012). Međutim, ekspresija ostalih gena koji se nalaze nizvodno u biosintetskom putu trepena kod ove dve vrste se povećavala tokom suše i to posebno kod *S. chilense*, vrste koja se smatra otpornom na sušu. Yadav i saradnici (2014) su u biljci *A. annua* tokom perioda suše uočili izrazito smanjenje ekspresije *DXR*, *DXS*, *HMGR* i još nekoliko gena koji učestvuju u biosintezi seskviterpena artemizina. Ispitivanja ekspresije gena koji učestvuju u biosintetskom putu LD tokom procesa rehidracije do sada nisu zabeležena u literaturi. Rezultati koje smo dobili qPCR analizom jasno ukazuju da je potrebno najmanje dva dana (48 h) rehidracije da bi se ekspresija gena *HMGR*, *GGPS1* i *DXR* vratila na nivo kontrole, dok se ekspresija *CLS* i *DXS* gena ni nakon 5 dana nije vratila na kontrolni nivo (Slika 32). Podaci u literaturi ukazuju da na ekspresiju određenih gena tokom procesa rehidracije može uticati predtretman sušom (dehidracija), pri čemu jačina i trajanje ovog predtretmana ima izuzetan značaj (Xu i sar., 2010).

Bez obzira na vrlo izražene promene u ekspresiji gena koji učestvuju u biosintetskom putu LD, relativna količina ovih jedinjenja se nije značajno menjala tokom procesa dehidracije/rehidracije eksplantata *C. creticus* u kulturi *in vitro* (Slika 36). Prilikom istraživanja drugih autora utvrđeno je da se tokom vodnog deficita emisija monoterpena iz *Pinus helepensis* ne menja, dok emisija seskviterpena značajno raste (Ormeno i sar., 2007). Isti autori su pokazali da je kod *Quercus coccifera* zapravo obrnuto, tj. količina monoterpena raste, a seskviterpena se ne menja. Primetna je bila i razlika u emisiji različitih monoterpena kao što su α -pinen i β pinen (Ormeno i sar., 2007). U eksperimentima Yadav i saradnika (2014) u kojima je zabeleženo značajno smanjenje ekspresije ključnih gena biosintetskog puta terpena (*DXR*, *DXS* i *HMGR*), detektovana je i smanjena produkcija seskviterpena artemizina, mada je činjenica da je analiza ukupne količine ovog jedinjenja merena nakon par meseci izlaganja vodnom deficitu. Međutim, Marchese i saradnici (2010) su nakon kratkotrajnog izlaganja biljaka *A. annua* vodnom deficitu utvrdili da nakon 38 h dolazi do značajnog povećanja količine artemizina, da bi se nakon 86 h količina ovog jedinjenja smanjila. Opšti zaključak je da promene u ekspresiji gena MEP puta ne dovode uvek do promena u produkciji terpenskih metabolita, ukazujući da dodatni posttranskripcioni mehanizmi uspostavljaju drugi nivo kontrole u regulaciji aktivnosti enzima MEP biosintetskog puta (Ghassemian i sar., 2006). Takođe regulacija ova dva biosintetska puta terpena može

biti i na posttranslacionom nivou, uključujući fosforilaciju, defosforilaciju, formiranje nekovalentnih veza sa molekulima efektorima itd. (Hemmerlin i sar., 2012).

Na osnovu prikazanih rezultata u okviru ove disertacije uočljivo je da dehidratacija ne dovodi do pozitivne regulacije produkcije LD u listovima *C. creticus* gajenim *in vitro*. U literaturi postoje podaci da se npr. ukupna količina abietanskih diterpena ne menja tokom vodnog deficita, ali da se njihov kvalitativni sadržaj menja. Naime smanjuje se sadržaj karnozične kiseline, dok se sadržaj njenih oksidovanih produkata povećava (Munné-Bosch i sar., 2001). Stoga je moguće da bi detaljnija istraživanja tačne promene količine pojedinačnih diterpena labdanskog tipa ukazala na sličan obrazac akumulacije kod *C. creticus*.

5.2.2. Efekat povrede na regulaciju produkcije labdanskih diterpena u izdancima *C. creticus* gajenih *in vitro*

Značajan abiotički stresogeni faktor koji takođe može da utiče na biosintezu terpena je povreda. U mnogim biljnim vrstama uočeno je da dolazi do povećane produkcije terpena nakon mehaničke povrede (Funk i sar, 1994; Langenheim, 1994; Steele i sar, 1998). Lafever i saradnici (1994) su pokazali da povreda indukuje i 400 puta veću aktivnost diterpen sintaza (prvenstveno abietadienskih sintaza), dok su Funk i saradnici (1994) utvrdili značajan porast citohrom P-450 oksigenaza. Steele i saradnici (1998) su ukazali da nakon povređivanja dolazi do naglog povećanja ekspresije monoterpen sintaza i nešto slabijeg povećanja seskviterepen i diterpen sintaza. Byun-McKay i saradnici (2006) su pokazali da je akumulacija terpena nakon povređivanja uslovljena povećanom transkripcijom gena koji učestvuju u biosintetskim putevima ovih metabolita. Dalja istraživanja su ukazala da povređivanje utiče na povećanje ekspresije određenih *DXS*, *DXR* i *HDR* gena (Phillips i sar., 2007, Kim i sar., 2009).

Rezultati analize ekspresije različitih gena biosintetskog puta LD u biljkama *C. creticus* gajenih *in vitro* ukazuju da povreda indukuje naglo povećanje ekspresije *HMGR* gena iz MVA puta, kao i *DXS*, *DXR*, *GGPPS1* i *CLS* gena iz MEP puta (Slika 31). Nakon relativno kratkog vremenskog perioda ekspresija posmatranih gena se vraća

na kontrolni nivo. Ovi rezultati ukazuju na neophodan oprez pri radu sa biljkama u kulturi *in vitro* s obzirom da svaka subkultivacija ili postavka eksperimenta uključuje i mehaničko poverđivanje biljaka koje može dovesti do lošeg tumačenja efekata određenih faktora ili supstanci na biosintetske puteve terpena. U ranijim eksperimentima analiza ekspresije nekih od ovih gena je određena nakon povređivanja biljaka *C. creticus* iz prirode i utvrđeno je da sličan odgovor u datim uslovima pokazuju *HMGR* i *DXS* geni, čija je ekspresija nakon naglog povećanja opala na kontrolni nivo, dok se ekspresija *DXR*, *GGPPS1* i *GGPPS2* gena tokom vremena nije menjala (Pateraki i Kanellis, 2010). Povećanje *HMGR* gena indukovano povredom uočeno je i u biljkama *Solanum tuberosum* (Yang i sar., 1991). Generalno, povećanje ekspresije *HMGR* gena može se objasniti potrebom biljke za fitosterolima, glavnim komponentama ćelijskih membrana koji mogu pomoću u popravci oštećenja nakon mehaničkih povreda ili napada insekta (Pateraki i Kanellis, 2010). Pateraki i Kanellis (2010) ukazuju da brzo povećanje ekspresije ovog gena može dovesti i do povećanja produkcije seskviterpenskih fitoaleksina, koji takođe učestvuju u zaštiti povređenog tkiva (Threlfall i Whitehead, 1991), a da generalno povećanje ekspresije gena *MEP* puta može ukazati na potrebu biljke i za povećanom produkcijom mono i diterpena kako bi zalečila i/ili izolovala povređeno područje od invazije patogena (Steele i sar., 1998). Poznato je da se diterpeni smole poput abietanske kiseline koja se formira oksidacijom produkata terpenskih ciklaza, luče kao oleorezin zajedno sa isparljivim jedinjenjima nakon povređivanja, a njihovom polimerizacijom (nekon evaporacije monoterpena) se formira čvrst zaštitni sloj preko povređenog područja (Trapp i Croteau, 2001b; Martin i sar., 2003). Falara i saradnici (2010) su ukazali da LD mogu imati ulogu i u direktnoj i u indirektnoj odbrani od herbivora, dok su Seo i saradnici (2003) pokazali da labd-11,13-diene-8 α ,15-diol predstavlja endogeni signal odgovoran za aktivaciju odbrambenog odgovora biljke. U povređenim izdancima *C. creticus* gajenim *in vitro* nije uočeno statistički značajno povećanje relativne količine ukupnih LD ni nakon 24h od povrede (Slika 35). Stoga se može pretpostaviti da je povećana ekspresija gena biosintetskog puta terpena eventualno dovela do povećane produkcije mono i seskviterpena, ali da bi se to potvrdilo neophodna su detaljnija ispitivanja.

5.2.3. Efekat ugljenih hidrata na regulaciju produkcije labdanskih diterpena u izdancima *C. creticus* gajenih *in vitro*

UH ne predstavljaju samo izvor energije za rast biljaka, već imaju i ulogu regulatornih i signalnih molekula koji mogu da kontrolišu razviće biljaka od klijanja, preko vegetativnog i reproduktivnog razvoja do formiranja semena (Smeekens, 2000; Rolland i sar., 2006; Todorović i sar., 2006; Mohamed i Alsadon 2010). Kao regulatorni molekuli šećeri dovode do izmene ekspresije gena i enzimatskih aktivnosti (Smeekens, 2000,) i omogućavaju adaptaciju metabolizma biljaka na promenljive uslove spoljašnje sredine i dostupnosti nutritijenata (Rolland i sar., 2002) utičući i na produkciju sekundarnih metabolita. Tako je npr. povećanje koncentracije šećera (glukoze, saharoze i fruktoze) u medijumu indukovalo povećanja produkcije sekoiridoida i ksantona u izdancima, ali istovremeno i do smanjenja sadržaja ksantonskih jedinjenja u korenovima *Centaurium pulchellum* gajenim *in vitro* (Krstić i sar., 2003). Najviše koncentracije šećera su dovodile do smanjenja produkcije ovih metabolita (Krstić i sar., 2003). Povećanje sadržaja saharoze dovelo je do povećanja produkcije ruzmarinske kiseline u kulturi suspenzija ćelija *Lavandula vera* (Ilieva i Pavlov, 1997), kao i ksantona u kulturi izdanaka *C. erythraea* (Janković i sar., 2000) i kulturi korenova *Gentiana dinarica* (Krstić–Milošević i sar., 2013). Dodatak 0,175 M saharoze u medijumu uslovalo je najveću produkciju feniletanoidnih glikozida u kulturi ćelija *Cistanche deserticola* (Liu i Cheng, 2008), dok je na medijumu sa 7% saharoze izmerena najveća akumulacija karotenoida u kulturi kalusa *Calendula officinalis* (Legha i sar., 2012).

Imajući u vidu da dva prekursora MEP biosintetskog puta (D-glicerinaldehid 3 fosfat i piruvat) nastaju direktno u procesima fotosinteze ili glikolize, ne iznenađuje činjenica da nivoi ugljenih hidrata mogu da regulišu MEP biosintetski put menjajući ekspresiju određenih enzima (Cordoba i sar, 2009). Dostupnost ugljenih hidrata kao i prisustvo specifičnih šećera (npr. saharoze) utiču na povećanu ekspresiju brojnih gena, uključujući i gene koji učestvuju u biosintezi fenolnih jedinjenja (Hara i sar., 2003; Solfanelli i sar. 2006). Dosadašnji literaturni podaci o uticaju različitih šećera na promenu ekspresije gena koji učestvuju u biosintezi terpena su veoma oskudni. Pokazano je da saharoza utiče na akumulaciju transkripata nekoliko gena MEP puta u biljkama *Arabidopsis thaliana* gajenim u mraku među kojima su bili *DXR* i *DXS* geni

(Hsieh i Goodman, 2005). Povećanje ekspresije ova dva gena, kao i još četiri gena uključena u biosintezu seskviterpena artemizina, zabeleženo je i u klijancima *Artemisia annua* koji su gajeni na 3% glukozi (Arsenault i sar., 2010). Gajenje *A. annua* na medijumu sa glukozom indukovalo je povećanje količine artemizina u biljkama u odnosu na one koje su gajene na saharozi (Wang i Weathers, 2007), dok fruktuza nije imala efekat kako na promenu ekspresije ispitivanih gena, tako i na količinu artemizina (Arsenault i sar., 2010; Nguyen i sar., 2011). Iako promena ekspresije ispitivanih gena pri gajenju klijanaca na glukozi nije bila u korelaciji sa povećanjem količine artemizina i njegovih metabolita, autori su zaključili da šećeri imaju, pored nutritivne, veoma važnu signalnu ulogu i da mogu uticati na regulaciju produkcije artemizina (Arsenault i sar., 2010; Nguyen i sar., 2011).

U eksperimentima sa izdancima *C. creticus* gajenim *in vitro* na medijumu sa različitim šećerima promena ekspresije ispitivanih gena takođe nije bila u korelaciji sa detektovanom relativnom količinom LD (Slika 30 i Slika 34). Naime, ekspresija svih 5 gena u izdancima *C. creticus* gajenim na medijumu sa dodatkom različitih koncentracija saharoze i glukoze se nije značajno menjala u zavisnosti od koncentracije ovih šećera. Nasuprot tome, zabeleženo je značajno povećanje relativne količine LD u izdancima koji su gajeni na podlozi sa saharozom ili glukozom u koncentraciji od 0,06 M ili 0,1 M (Slika 34). U izdancima *C. creticus* koji su gajeni na medijumu sa 0,1 M fruktozom detektovano je statistički značajno povećanje ekspresije *DXS* i *CLS* gena, u odnosu na izdanke koji su gajeni na medijumu sa nižim koncentracijama fruktoze, ali nije uočena promena relativne količine LD. Najviša koncentracije svih šećera od 0,3 M dovela je do smanjenja relativne količine LD u izdancima *C. creticus*.

Generalno nabolji parametri rastanja i razvića, praćeni najvišom akumulacijom LD u izdancima *C. creticus* gajenim *in vitro* bili su na medijumu sa 0,1 M glukozom (Slika 20, Slika 21 i Slika 34). Sličan efekat glukoze pokazan je i u kulturi *in vitro* *Nepeta ratanjensis* (Mišić i sar., 2005b), gde je praćena akumulacija monoterpena nepetalaktona. Dosadašnji rezultati o efektu UH na rastanje, razviće, ali i na akumulaciju sekundarnih metabolita u izdancima *C. creticus* prezentovani po prvi put u okviru ove disertacije mogu biti od velike koristi za eventualnu masovnu *in vitro* kultivaciju *C. creticus* u cilju povećane produkcije LD. Dalja analiza dinamike

ekspresije gena koji učestvuju u biosintezi LD u budućnosti bi mogla da ukažu da li i na koji način saharoza ili glukoza indukuju akumulaciju LD u biljkama *C. creticus*.

5.3. Analiza biološke aktivnosti etanolnih ekstrakata *C. creticus* sa osvrtom na značaj labdanskih diterpena

5.3.1. Antioksidativna aktivnost

Poslednjih decenija velika pažnja se posvećuje preventivnoj medicini koja propagira upotrebu antioksidanasa biljnog porekla u ishrani i terapiji. Zahvaljujući prisustvu antioksidanasa poput vitamina C, vitamina E, karotena, ksantofila i tanina, lekovite i začinske biljke se smatraju moćnim antioksidanasima. U okviru prirodnih jedinjenja biljnog porekla koja imaju veliki antioksidativni potencijal posebno se ističu fenolne kiseline (galna, kafeinska, ruzmarinska kiselina) i flavonoidi (kvercetin, katehin) (Wright i sar., 2001; Shan i sar., 2005). Pokazano je da i izoprenoidna jedinjenja kao konstituenti etarskih ulja ili ekstrakata imaju antioksidativnu aktivnost, pri čemu su među njima najjači antioksidansi karotenoidi i diterpeni abietanskog tipa, a neki od njih imaju fenolnu strukturu u molekulu (karnozol i karnozična kiselina) (Grassmann i sar., 2002; Matkowski, 2008).

Uzimajući u obzir da vrste roda *Cistus* sadrže značajnu količinu polifenolnih jedinjenja ispitivana je njihova antioksidativna aktivnost (Attaguile i sar., 2000; Barrajón-Cataláni sar., 2010; 2011). Alsabri i sar. (2012) su pokazali da ekstrakti *C. incanus* imaju veću antioksidativnu aktivnost od ekstrakata *C. parviflorus*. Autori su pripisali detektovanu antioksidativnu aktivnost fenolnim jedinjenjima (Alsabri i sar., 2012). Vodeni ekstrakti *C. monspeliensis* i *C. incanus* su imali protektivni efekat na razdvajanje DNK („cepanje“ eng. *DNA cleavage*) istovremeno pokazujući dozno-zavisni (koncentracijsko-zavisni) kapacitet u „hvatanju“ slobodnih radikala (Attaguile i sar., 2000). Ekstrakt *C. monspeliensis* je bio mnogo aktivniji od ekstrakta *C. incanus*. Antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta *C. ladanifer* takođe je objašnjena prisustvom fenolnih jedinjenja (Andrade i sar., 2009; Amensour i sar., 2010). Nedavno je u okviru ispitivanja pokazana DPPH aktivnost etarskog ulja *C. creticus* (Loizzo i sar.,

2013) u kome su kao najzastupljenija jedinjenja detektovani norizoprenoidi i diterpeni, a ne labdanski diterpeni. Farjam i saradnici (2013) su u okviru istraživanja bioloških aktivnosti biljke *Salvia sharifii* pokazali da fenolna jedinjenja imaju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na labdanske diterpene (konkretno 13-epi-manoil oksid). Međutim, antioksidativna aktivnost *Salvia officinalis* je pripisana abietanskim diterpenima pre nego fenolima (Matkowski, 2008). Papageorgiou i saradnici (2008) su takođe antioksidativnu aktivnost ekstrakata žalfije (*Salvia officinalis*) povezali sa koncentracijom oksidovanih diterpena i seskviterpena. U poređenju sa fenilpropanoidnim polifenolima, terpeni (izoprenoidi) su generalno više lipofilni, pa se stoga smatra da prvenstveno učestvuju u zaštiti membranskih lipida (Matkowski, 2008).

Etanolni ekstrakti izdanaka, netransformisanih i transformisanih korenova *C. creticus* su pokazali dobru antioksidativnu aktivnost (Tabela 20 i Tabela 21). S obzirom da u ekstraktu korenova nisu detektovani LD, a da je najmanji antioksidativni potencijal imao ekstrakt netransformisanih korenova sa najmanjim ukupnim sadržajem fenola i flavonoida (Slika 44), antioksidativni potencijal *C. creticus* se prvenstveno može pripisati detektovanim fenolnim jedinjenjima. Naime ova grupa jedinjenja učestvuje u deaktivaciji slobodnih radikala (Tepe i sar., 2004; Capecka i sar., 2005; Četković i sar., 2007), pri čemu postoje razlike u pogledu antioksidativne aktivnosti između glavnih grupa fenolnih jedinjenja. Derivati cimetine kiseline (kafeinska, ruzmarinska, ferulinska, hlorogena kiselina) imaju bolju antioksidativnu aktivnost od derivata benzojeve kiseline (vanilinska, galna, elaginska kiselina), dok flavonoidi u odnosu na flavonole pokazuju veći antioksidativni potencijal (Soobratte i sar., 2005). Fenolna jedinjenja generalno deluju kao „hvatači“ slobodnih radikala, a flavonoidi mogu i da heliraju metale (Brewer, 2011). Jedna od karakterističnih fenolnih jedinjenja identifikovana u svim ispitivanim ekstraktima *C. creticus* su hininska kiselina, katehin, galokatehin i njihovi dimeri (Tabela 19) čiji je antioksidativan potencijal dobro poznat (Shan i sar., 2005; Iacopini i sar., 2008; Brewer, 2011). Nedavna klinička *in vivo* istraživanja delotvornosti hininske kiseline kao antioksidansa su pokazala da je ovo jedinjenje zapravo pro - metabolit koji kod ljudi nakon konzumiranja dovodi do indukcije aktivnih nivoa nikotinamida i triptofana kao antioksidanasa (Pero i sar., 2009).

U pojedinim istraživanjima ispitivan je odnos između antioksidativne aktivnosti biljaka i sadržaja polifenolnih jedinjenja u njima, pri čemu su pojedini autori pokazali da postoji povezanost između ova dva parametra (Zheng i Wang 2001; Shan i sar., 2005), dok drugi nisu mogli da je utvrde (Kahkonen i sar., 1999). Kratchanova i sar. (2010) ukazuju da količina ukupnih fenolnih jedinjenja nije uvek u saglasnosti sa antioksidativnom aktivnošću nekog ekstrakta, jer veoma često dolazi do sinergističkih ili antagonističkih interakcija između pojedinačnih komponenti uzorka, u zavisnosti od njihove strukture i međusobne interakcije. Iacopini i saradnici (2008) su pokazali da se antioksidativni potencijal pojedinačnih fenola razlikuje u slučaju kada se primenjuju kao posebna jedinjenja i u slučaju kada se upotrebljavaju kao smeše, dok su Benavente-García i saradnici (2000) pokazali sinergistički efekat fenolnih jedinjenja u ekstraktu *Olea europaea*.

Na osnovu svega izloženog, pokazan antioksidativni potencijal ekstrakata *C. creticus* se može prvenstveno pripisati kompleksnoj smeši fenolnih jedinjenja i njihovim međusobnim interakcijama. Ovim upotreba *in vitro* kulture organa i/ili biljaka *C. creticus* dobija na još većem značaju, jer se u strogo kontrolisanim uslovima može dobiti biljni materijal uniformnog, konstantnog sastava nezavisno od klime, sezone, i drugih faktora spoljašnje sredine koji u velikoj meri mogu da utiču na variranje hemijskog sastava etarskih ulja i ekstrakata biljaka iz prirode ili plantažno gajenih (Robles i Garzino, 2000; Sangwan i sar., 2001; Demetzos i sar., 2002).

5.3.2. Antimikrobna aktivnost

Etarska ulja i jedinjenja izolovana iz biljaka predstavljaju jedan od glavnih izvora medikamentata za lečenje bolesti koje izazivaju patogeni mikroorganizmi (Sakagami i sar., 2002; Rios i Recio, 2005; Reichling i sar., 2009; Silva i Fernandes Júnior, 2010). Pored farmaceutske, i u prehrambenoj industriji postoji tendencija da se smanji upotreba antibiotika i sintetičkih hemikalija tokom procesa očuvanja hrane (Gallucci i sar., 2009; Savoia, 2012). Pokazano je da primena etarskih ulja ili njihovih komponenti, bilo pojedinačno ili u kombinaciji s drugim konzervansima, može kontrolisati rast bakterija i drugih patogenih mikroorganizama hrane (Brehm-Stecher i Johnson, 2003;

Santiesteban-López i sar, 2007; Gallucci i sar., 2009), pri čemu upotreba prirodnih supstanci biljnog porekla indukuje minimalnu štetu nutritivnim i organoleptičkim svojstvima nekih vrsta prehrambenih proizvoda (Gallucci i sar., 2009). Na ovaj način, kvalitet tretiranih proizvoda može biti značajno bolji od konvencionalno prerađenih proizvoda i stoga se mogu ispuniti potrebe i zahtevi kako proizvođača hrane, tako i samih potrošača (Gallucci i sar., 2009). U poslednje vreme intenzivne studije su usmerene ka ispitivanju mogućnosti upotrebe biljnih ekstrakata i etarskih ulja aromatičnih biljnih vrsta u tretmanima protiv patogenih bakterija i gljiva (Silva i Fernandes Júnior, 2010; Savoia, 2012).

Antimikrobna aktivnost etarskog ulja i smole vrste *C. creticus* su pokazana od strane nekoliko autora (Chinou i sar., 1994, Demetzos i sar., 1997, Chinou, 2005). Glavni antimikrobni efekat je pripisan labdanskim diterpenima prvenstveno izomerima manoil oksida (Demetzos i Dimas, 2001). Pokazano je da je većina LD imala značajnu antibakterijsku aktivnost na *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivna), *Pseudomonas aeruginosae* i *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativna) (Demetzos i sar., 1994; Chinou i sar., 1994), dok je labd-13-en-8 α ,15-diol jedini pokazao antifungalnu aktivnost na gljivu *Candida albicans* (Chinou i sar., 1994). Labd -7,13(E)-dien-15-ol jedini nije imao antimikrobnu aktivnost što su Chinou i sar. (1994) pripisali postojanju dvogube veze na C7-C8 atomu. Demetzos i saradnici (1997) su ukazali da je antibakterijska aktivnost etarskog ulja *C. creticus* subsp. *eriocephalus* bila slabija prema Gram-negativnim bakterijama (*E. coli*, *P. aeruginosa*) nego prema Gram-pozitivnim bakterijama (*B. cereus*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* i *B. subtilis*) i gljivi *C. albicans*. Na osnovu komparativnih rezultata antistafilokokne aktivnosti različitih LD pokazano je da je za ovu aktivnost odgovoran diterpen sklareol koji je imao bolju aktivnost za razliku od svog acetil derivata koji je bio neaktivan (Demetzos i sar., 1999). Slični rezultati su dobijeni i u ispitivanjima antifungalne aktivnosti etarskih ulja različitih vrsta *Salvia* (*S. officinalis*, *S. desoleana*, *S. sclarea*), koja su pokazala da je najveću aktivnost posedovalo etarsko ulje *S. sclarea*, u kome je sklareol bio najdominantnije jedinjenje (Soković 2001, neobjavljeni podaci). Ulubelen i saradnici (1994) su pokazali da je sklareol imao antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus*, ali je bio potpuno neaktivan u slučaju *C. albicans* i *Proteus mirabilis*.

Antimikrobna aktivnost je potvrđena i za etarska ulja nekih drugih vrsta roda *Cistus*. Tako etarsko ulje *C. monospeleensis* u kome su LD bili dominantni je imalo značajno izraženiju antimikrobnu aktivnost od ulja *C. parviflorus* (Demetzos i sar., 1990). Poznato je da različiti terpeni kombinovani u smeši mogu ili da smanjuju ili da povećavaju antimikrobnu aktivnost, u zavisnosti od svojih relativnih koncentracija i ukupne osetljivosti ciljnog mikroorganizma (Cox i sar., 2001; Gallucci i sar., 2009). Nekoliko istraživanja je ukazalo da su glavne terpenske komponente odgovorne za biološku aktivnost etarskih ulja različitih biljaka (Deans i sar., 1995; Demetzos i sar., 1997). Međutim, postoje dokazi i da komponente prisutne u manjoj koncentraciji imaju ključnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata biljka, verovatno delujući sinergistički sa ostalim komponentama (Gallucci i sar., 2009). Sa ovog stanovišta važno je ukazati na istraživanja antimikrobne aktivnosti *Cistus ladanifer* i *C. populifolius*, u kojima je njihova antimikrobna aktivnost pripisana prisutnim fenolnim jedinjenjima (Barrajón-Catalán i sar., 2010). Interesantno je istaći da je ekstrakt *C. populifolius* koji je imao veći sadržaj fenolnih jedinjenja imao veću antibakterijsku aktivnost prema *E. coli*, i pri tome veoma sličnu aktivnost kao i neomicin (Barrajón-Catalán i sar., 2010), dok je kao što je već pomenuto *E. coli* bila rezistentna kada je tretirana samo labdanskim diterpenima (Chinou i sar., 1994, Demetzos i sar., 1997). Uzimajući u obzir rezultate ove disertacije jasno se uočava velika senzitivnost *E. coli* kako na ekstrakte izdanaka, tako i na ekstrakte korenova *C. creticus*, koja je bila mnogo veća nego osetljivost na streptomycin i ampicilin. Razmatrajući hemijski sastav ovih ekstrakata (Tabela 17, Tabela 18, Tabela 19, Slika 44), kao i prethodne literaturne nalaze, fenolnim jedinjenjima se može pripisati glavna antimikrobna aktivnost prema *E. coli*. Važno je ipak napomenuti da se na osnovu različitih MBC vrednosti koje su bile niže za ekstrakte izdanaka ne može isključiti sinergističko delovanje prisutnih diterpena labdanskog tipa i fenolnih jedinjenja.

U ovoj disertaciji je po prvi put ispitano antimikrobno dejstvo etanolnih ekstrakata i izdanaka i korenova *C. creticus* na osam vrsta bakterija i sedam vrsta gljiva (Tabela 22 i Tabela 23). Generalno većina bakterija koje su korišćene u ispitivanjima antimikrobne aktivnosti u ovoj disertaciji mogu dovesti do veoma ozbiljnih infekcija i bolesti kod ljudi i životinja. *Staphylococcus aureus* je glavni ljudski patogen koji uzrokuje širok spektar infekcija, u rasponu od površinskih infekcija rana do sepse i toksičnog šok

sindroma koji su opasni po život (Bore i sar., 2007). Već pomenuta *Escherichia coli* predstavlja normalni deo mikroflore crevnog trakta čoveka gde učestvuje u varenju hrane i sintezi nekih jedinjenja poput vitamina B12. Kod ljudi sa oslabljenim imunim sistemom može dovesti do zdravstvenih poremećaja. *E. coli* može izazvati kako intestinalne infekcije, tako i infekcije urinarnog trakta i meningitis (Levine, 1984). Pored ovih veoma značajnih bakterijskih sojeva koji su već ranije testirani sa etarskim uljima *C. creticus*, u okviru ove disertacije, testirani su i neki novi sojevi iz roda *Lysteria*, *Salmonella*, *Micrococcus* i *Bacillus*. *Listeria monocytogenes* je patogena, gram pozitivna bakterija koji često može naći u hrani (Ramaswamy i sar., 2007). Izazivač je listerioze, veoma opasne bolesti, pogotovo kod trudnica, starijih ljudi i ljudi sa oslabljenim imunim sistemom (Ramaswamy i sar., 2007). *Lysteria* može da živi na temperaturama u opsegu od -18 °C do + 10 °C, pa se može naći i u namirnicama koje su zamrzavane (Ramaswamy i sar., 2007). Sve vrste roda *Salmonella* su patogene za ljude i izazivaju razna oboljenja poznata kao salmoneloze, pa tako i *Salmonella typhimurium* (Olsen i sar., 2001). *Bacillus cereus* proizvodi termolabilne i termostabilne toksine koji uzrokuju dijareju ili povraćanje (Jay i sar., 2005) i čest je uzročnik kvarenja sireva i pasterizovanog mleka. *Micrococcus* najčešće naseljava kožu sisara, ali se može naći i u mesu i mleku (Smith i sar., 1999). Spada u organizme sa slabom i ograničenom patogenošću (Smith i sar., 1999).

Mikotoksini predstavljaju sekundarne metabolite gljiva koji mogu da dovedu do nastanka mnogih akutnih i hroničnih oštećenja zdravlja ljudi (Kavanagh i sar., 2005; Bath i sar., 2010; Reddy i sar., 2010). Pojedini mikotoksini su mutageni i/ili kancerogeni, dok neki pokazuju toksičnost prema specifičnim organima (Jay i sar., 2005). Određeni rodovi mikromiceta kao što su *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Trichothecium*, *Byssochlamys* i *Sclerotinia* mogu imati štetno dejstvo i u prehrambenoj industriji (Kavanagh i sar., 2005). Naime ove mikrogljive se mogu pojaviti na biljkama u samom polju, neke tokom žetve, a neke prilikom neprimerenog skladištenja, a zatim mogu dovesti do kontaminacije namirnica koje koriste kako životinje, tako i ljudi (Jay i sar., 2005; Kavanagh i sar., 2005). Za ispitivanje antifungalne aktivnosti u okviru ove disertacije korišćene su gljive koje proizvode različite mikotoksine: *Aspergillus flavus* (proizvode aflatoksine, ciklopiazoničnu kiselinu), *A. fumigatus* (gliotoksin), *A. versicolor* (geostomin, sterigmatocistin),

Trichoderma viride (trikodermin, trihotoksin A), *Penicillium* (griseofulvin, ohratoksin A, B i C, rokuefortin C, ketoglobosin B, verukulogen, penitrem A, patulin, citrinin), *Fusarium verticillioides* (fumonizini) (Gravsen i sar., 1994; Harris i Mantle, 2001; Madheswaran i sar., 2004; Sokolović i Šimpraga, 2006; Hedayati i sar., 2007)

Svi etanolni ekstrakti izdanaka i korenova (transformisanih i netransformisanih) *C. creticus* su pokazali odličnu antibakterijsku aktivnost, koja je u slučaju gotovo svih testiranih bakterija bila viša od aktivnosti referentnih antibiotika streptomicina i ampicilina (Tabela 22). Osim toga svi ekstrakti su pokazali sličnu antifungalnu aktivnost kao komercijani fungicid bifonazol, ali značajno bolju od drugog referentnog fungicida – ketokonazola. U nekim slučajevima aktivnost je bila i 17 puta veća od aktivnosti referentnog fungicida (Tabela 23). Specifično antimikrobno dejstvo može se objasniti različitom kvantitativnom i kvalitativnom sastavu ispitivanih ekstrakata, uzimajući u obzir da se etanolni ekstrakti izdanaka i korenova *C. creticus* razlikuju u pogledu prisustva i količine glavnih grupa terpena i fenolnih jedinjenja.

Na osnovu rezultata ove disertacije koji opisuju značajnu i specifičnu antimikrobnu aktivnost, etanolni ekstrakti ne samo izdanaka, već i korenova *C. creticus* gajenih u kulturi *in vitro* se mogu preporučiti kako za prevenciju, tako i za lečenje različitih bolesti izazvanih ispitivanim patogenim mikroorganizmima, ali i kao konzervans u prehrambenoj industriji.

5.3.3. Citotoksična aktivnost

Poznato je da diterpeni labdanskog tipa predstavljaju važna jedinjenja iz prirode koja poseduju različite biološke aktivnosti (Chinou, 2005). Nekoliko LD biljke *C. creticus* je pokazalo citotoksičnu aktivnost prema ćelijama kancera, pri čemu je sklareol među njima najviše ispitivan (Demetzos i Dimas, 2001; Chinou, 2005). U okviru ove disertacije citotoksična aktivnost etanolnog ekstrakta izdanaka *C. creticus* gajenih *in vitro* pokazana je prema HeLa, MDA-MB-453 i FemX ćelijama kancera (Slika 46; Skorić i sar., 2012). Kao što je ranije prikazano u ovom ekstraktu dominantno jedinjenje

bilo je labd-7,13-dien-15-ol acetat. U literaturi postoje podaci o efektu ovog jedinjenja samo prema MOLT3, RAJI i H9 ćelijskim linijama kancera (Demetzos i sar., 1994).

Nešto opširnija istraživanja su urađena sa sklareolom, labd-7,13-dien-15-olom, labd-13(E)-ene-8 α ,15-diolom, manoil oksidom i njegovim izomerima, pri čemu su citotoksični i citostatički efekti ovih jedinjenja prvenstveno potvrđeni na ćelijama humane leukemije (Chinou i sar., 1994, 2005; Dimas i sar., 1998, 1999, 2001). Sklareol i labd-7,13-dien-15-ol su imali citotoksičnu aktivnost i prema ćelijama kancera dojke (MCF7), CNS (SF268), NSCL (NCI-H460), SLC (DMS114) i kolona (HCT116) (Dimas i sar., 1999; Hatziantoniou i sar., 2006; Matsingou i sar., 2006), dok je prema ćelijama kancera prostate (PC-3), melanoma (UACC62), jajnika (OVCAR5) i bubrega (SN12K1) pokazana aktivnost samo sklareola (Hatziantoniou i sar., 2006).

Citotoksična aktivnost karakterističnih diterpena labdanskog tipa *C. creticus* prema HeLa ćelijama kancera cerviksa je prvi put zabeležena nedavno (Skorić i sar., 2012) i predstavlja deo rezultata ove doktorske disertacije (Slika 46). Veliki značaj ima i pokazana citotoksična aktivnost prema do sada neispitanim linijama ćelija kancera dojke (MDA-MB-453) i melanoma (FemX). Dalja istraživanja uz korišćenje kultura normalnih ćelija omogućila bi razgraničenje antitumorskog od opšteg citotoksičnog dejstva.

U literaturi nema podataka o analizi citotoksične aktivnosti korenova *C. creticus*. Iako u etanolnom ekstraktu korenova nisu detektovani LD, detektovane su masne kiseline, fenoli i flavonoidi (Tabela 18, Slika 44). Nedavna istraživanja su ukazala da masne kiseline promovisu apoptozu i nekrozu Raji ćelija i pokazuju toksične efekte na ćelije melanoma (SK-Mel 23) (Cury-Boaventura i sar., 2005; de Sousa Andrade i sar., 2005). Takođe, poznato je da fenolna jedinjenja imaju i citotoksičnu aktivnost (Daayf i Lattanzio, 2008; Dai i Mumper, 2010). Nekoliko istraživanja je ukazalo da etanolni, aceton/etanolni, ili vodeni ekstrakti nekih vrsta roda *Cistus* pokazuju citotoksičnu aktivnost (Andrade i sar., 2009; Barrajon-Catalán i sar., 2010). Hemijska analiza ovih ekstrakata je ukazala da su dominantna jedinjenja bili polifenoli, flavonoidi i tanini, ali usled kompleksnosti ekstrakata nije bilo moguće pripisati ovaj citotoksičan efekat tačno određenoj grupi (Andrade i sar., 2009; Barrajon-Catalán i sar., 2010). Prema našim rezultatima prisustvo fenola i flavonoida je detektovano i u ekstraktima korena i

ekstraktima izdanaka (Slika 44), a zapravo jedina bitna razlika između ova dva ekstrakta je bilo prisustvo labdanskih diterpena u izdancima, tj. masnih kisellina u korenima. Stoga se, citotoksičan efekat dobijen samo pri tretmanima sa ekstraktima izdanaka može prvenstveno pripisati prisustvu LD (Skorić i sar., 2012), iako treba imati u vidu da terapijski citotoksični efekti biljnih ekstrakata mogu biti pod uticajem sinergističkog delovanja nekoliko komponenti kompleksnog ekstrakta biljaka (Ulrich-Merzenich i sar., 2010) ili metaboličke aktivacije biljnih jedinjenja u neouobičajenim biohemijском okruženju (Chen i sar., 2011).

Različita jedinjenja sa antitumorskom aktivnošću su izolovana iz viših biljaka, ali koncentracija ovih jedinjenja u biljkama je generalno mala (Neumann i sar., 2009), pri čemu akumulacija ovih jedinjenja zavisi od geografskih i uslova životne sredine. Stoga proizvodnja aktivnih citotoksičnih jedinjenja putem mikropropagacije biljaka predstavlja tehniku sa sve većim značajem (Nguyen i sar., 2001; Neumann i sar., 2009; Singh i Tiwari, 2010; Zuzarte i sar., 2010).

* * *

Rezultati koji ukazuju da su glavne komponente izolovane iz biljaka *C. creticus* gajenih *in vitro* labdanski diterpeni karakteristični i za etarska ulja i smolu ove biljke imaju veliki potencijal i pružaju mogućnost za dalju komercijalnu upotrebu *in vitro* kulture *C. creticus*. Sprovedena ispitivanja u strogo kontrolisanim i ponovljivim uslovima *in vitro*, otvaraju dalja istraživanja produkcije kako ove tako i ostalih grupa sekundarnih metabolita poput fenola i flavonoida, a u cilju povećanja njihove produkcije. Sa tim u vezi posebnu važnost imaju rezultati uspešne mikropropagacije i povećane akumulacije labdanskih diterpena na određenim koncentracijama šećera. Kultura transformisanih korenova takođe predstavlja potencijalni izvor značajnih sekundarnih metabolita, ali i dobro okarakterisan model sistem za dalja istraživanja biosintetskih puteva ovih jedinjenja. Poseban značaj imaju i rezultati koji su ukazali da ekstrakti izdanaka i korenova gajenih u uslovima *in vitro* poseduju izuzetnu biološku

aktivnost kako zahvaljujući prisustvu labdanskih diterpena, tako i prisustvu fenolnih jedinjenja. Upotreba *in vitro* kulture izdanaka i korenova *C. creticus* okarakterisane u ovoj disertaciji omogućava produkciju ekstrakata bez neželjenog variranja u sadržaju biološki aktivnih jedinjenja tokom cele godine, pri čemu se ovi ekstrakti mogu preporučiti za antibakterijsku, antifungalnu i citotoksičnu upotrebu.

6. ZAKLJUČCI

1. Uspešno je uspostavljena *in vitro* kultura biljaka *Cistus creticus* L. Parametri rastenja i razvića eksplantata na MS medijumu bez fitohormona nisu pokazali značajne razlike između analiziranih klonova. Klonovi su se jedino statistički značajno razlikovali u procentu ožiljavanja.
2. Labdanski diterpeni su dominantna jedinjenja u izdancima biljaka *C. creticus* gajenim *in vitro*, a među njima su sa oko 30% najzastupljeniji labd-7,13-dien-15-ol i labd-7,13-dien-15-ol acetat. Od isparljivih sekundarnih metabolita najzastupljeniji su monoterpeni i seskvitrepeni. Hemijskom analizom korenova *C. creticus* potvrđeno je prisustvo fenolnih jedinjenja i masnih kiselina, dok labdanski diterpeni nisu detektovani.
3. Kapitatne glandularne trihome tipa II *C. creticus* predstavljaju mesto akumulacije labdanskih diterpena i fenolnih jedinjenja. Labd-7,13-dien-15-ol acetat je sa oko 46% najzastupljenije jedinjenje u dihlormetanskim ekstraktima eksudata trihoma ovog tipa.
4. Uspešno je uspostavljena kultura transformisanih korenova *C. creticus*. Kulture transformisanih korenova je odlikovao karakterističan fenotip, kao i visok prirast mase (10 -12 puta u odnosu na početnu). Regeneracija transformisanih biljaka je bila neuspešna, mada su se formirale kalusne strukture. Labdanski diterpeni nisu detektovani ni u transformisanim korenovima, ni u kalusima. Ekspresija gena koji učestvuju u MEP biosintetskom putu labdanskih diterpena je bila izuzetno niska.
5. Nivo ekspresije gena koji učestvuju u MEP i MVA biosintetskom putu se povećava nakon indukovane povrede biljaka *C. creticus* gajenih *in vitro*. Ekspresija ovih gena vraća se na kontrolni nivo u okviru 24h od nastanka

povrede. U ovom periodu nije zabeležena promena u relativnoj količini labdanskih diterpena.

6. Proces dehidracije indukuje značajno smanjenje nivoa ekspresije gena koji su uključeni u MEP i MVA biosintetski put. Tokom rehidracije ekspresija se vraća na nivo kontrole, izuzev u slučaju *DXS* i *CLS* gena kod kojih je ekspresija niža od kontrole i nakon 5 dana rehidracije. Promene u relativnoj količini labdanskih diterpena u odnosu na kontrolne izdanke nisu bile statistički značajne.
7. U biljci *C. creticus* po prvi put je detektovano prisustvo dehidrina od 63 kDa i 66 kDa sa karakterističnom akumulacijom u procesu dehidracije/rehidracije što se u daljim ispitivanjima može koristiti kao dobar pokazatelj stresa izazvanog sušom.
8. Rastenje, razviće, ekspresija gena uključenih u MEP i MVA biosintetski put, kao i relativna količina ukupnih labdanskih diterpena u biljkama zavisi od vrste i koncentracije primenjenog šećera. Optimalne koncentracije šećera za rastenje i razviće biljaka *C. creticus* u uslovima *in vitro* su od 0,03 M do 0,1 M. Uočen je trend povećanja relativnog sadržaja labdanskih diterpena na medijumu sa 0,1 M saharozom ili 0,1 M glukozom. Uzimajući u obzir rezultate rasteња i razvića biljaka *C. creticus* u kulturi *in vitro* i rezultate regulacije produkcije labdanskih diterpena optimalna podloga u smislu najbolje produkcije ovih jedinjenja je MS podloga sa dodatkom 0,1 M glukoze.
9. Analiza sadržaja fenolnih jedinjenja ukazala je da su ova jedinjenja prisutna u izdancima, ali i u transformisanim i u netransformisanim korenovima *C. creticus*. U izdancima četiri klona sadržaj ukupnih fenola i flavonoida se nije razlikovao, a identifikovana su i karakteristična jedinjenja iz ove grupe sekundarnih metabolita kao što su hininska kiselina, galokatehin i katehin. U transformisanim korenovima sadržaj fenolnih jedinjenja je bio veći u odnosu na netransformisane korenove.

10. Antioksidativni potencijal ekstrakata izdanaka i korenova je bio u skladu sa količinom ukupnih fenola i flavonoida u njima: ekstrakti sa većom količinom fenolnih jedinjenja su imali bolji antioksidativni potencijal.
11. Svi etanolni ekstrakti izdanaka i korenova (transformisanih i netransformisanih) *C. creticus* poseduju antibakterijsku aktivnost, koja je u slučaju gotovo svih testiranih bakterija bila viša od aktivnosti referentnih antibiotika streptomicina i ampicilina. Dati ekstrakti su pokazali sličnu antifungalnu aktivnost kao i komercijani fungicid bifonazol, ali značajno bolju od drugog referentnog fungicida – ketonazola.
12. Etanolni ekstrakti izdanaka *C. creticus* su imali citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama kancera cerviksa, kao i na ćelije kancera dojke (MDA-MB-453) i melanoma (FemX), dok etanolni ekstrakti korenova nisu imali citotoksičnu aktivnost. Pokazana citotoksična aktivnost etanolnih ekstrakata izdanaka može se pripisati prisutnim diterpenima labdanskog tipa.

7. LITERATURA

- Abbasi, A., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, U., Voll, L.M. (2007) Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology* 143: 1720–1738.
- Adams, R.P. (2007) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhathagar, R.K., Mukherjee, S.K. (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 657 – 685.
- 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
- Åkesson, C., Lindgren, H., Pero, R.W., Leanderson, T., Ivars, F. (2005) Quinic acid is a biologically active component of the *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100®. *Int Immunopharmacol* 5: 219–222.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, M. (2013) Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21(2): 143-152.
- Alsabri, S.G., Zetrini, A.E., Ermeli, N.B., Mohamed, S.B., Bensaber, S.M., Hermann, A., Gbaj, A. (2012) Study of eight medicinal plants for antioxidant activities. *Journal of Chemical & Pharmaceutical Research*: 4(8): 4028-4031.
- Alviano, D.S., Alviano, C.S. (2009) Plant Extracts: Search for New Alternatives to Treat Microbial Diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10(1): 106-121.

- Amensour, M., Sendra, E., Pérez-Alvarez, J. A., Skali-Senhaji, N., Abrini, J., Fernández-López, J. (2010) Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* 65(2): 170-178.
- Anastasaki, T., Demetzos, C., Perdetzoglou, D., Gazouli, M., Loukis, A., Harvala, C. (1999). Analysis of Labdane-Type Diterpenes from *Cistus creticus* (subsp. *creticus* and subsp. *eriocephalus*), by GC and GC-MS1. *Planta medica* 65(08): 735-739.
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A.P. (2009) Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Industrial crops and products* 30(1): 165-167.
- Antonious, G.F., Kochhar, T.S. (2003) Zingiberene and curcumene in wild tomato. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 38(4): 489-500.
- Arif, T., Bhosale, J.D., Kumar, N., Mandal, T.K., Bendre, R.S., Lavekar, G.S., Dabur, R. (2009) Natural products–antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian natural products research* 11(7): 621-638.
- Arimura, G.I., Ozawa, R., Maffei, M.E. (2011) Recent advances in plant early signaling in response to herbivory. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 3723-3739.
- Arsenault, P.R., Vail, D.R., Wobbe, K.K., Weathers, P.J. (2010) Effect of sugars on artemisinin production in *Artemisia annua* L.: transcription and metabolite measurements. *Molecules* 15: 2302–2318.
- 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.
- 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.
- Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., Vanella, A. (2000) Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts

- from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. Cell biology and toxicology 16(2): 83-90.
- Augusti, A., Scartazza, A., Navari-Izzo, F., Sgherri, C.L.M., Stevanović, B., Brugnoli, E. (2001) Photosystem II photochemical efficiency, zeaxanthin and antioxidant contents in the poikilohydric *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. Photosynthesis Research 67: 79–88
- Aziz, N., Paiva, N.L., May, G.D., Dixon, R.A. (2005) Transcriptome analysis of alfalfa glandular trichomes. Planta 221: 28–38.
- 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.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., Van Staden, J. (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation 63(2): 147-173.
- Bais, H.P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R.M., Vivanco, J.M. (2003) Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. Science 301: 1377–1380.
- Bakkali, A. T.; Jaziri, M.; Foiriers, A.; Vander Heyden, Y.; Vanhaelen, M.; Home` s, J. (1997) Lawsone accumulation in normal and transformed cultures of henna, *Lawsonia inermis*. Plant Cell Tiss Organ Cult 51: 83–87.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food chemistry 99(1): 191-203.
- Baldwin, I.T., Gorham, D., Schmelz, E.A., Lewandowski, C.A., Lynds, G.Y. (1998) Allocation of nitrogen to an inducible defense and seed production in *Nicotiana attenuata*. Oecologia 115: 541–552.
- Ballhorn, D.J., Kautz, S., Jensen, M., Schmitt, S., Heil, M., Hegeman, A.D. (2011) Genetic and environmental interactions determine plant defences against herbivores. J Ecol 99: 313–326.

- Bandow, J.E, Brotz, H., Leichert, L.I.O, Labischinski, H., Heicker, M. (2003) Proteomic approach to understanding antibiotics action. *Antimicroagents Chemotherap* 47:945-955.
- Banerjee, S., Wang, Z., Mohammad, M., Sarkar, F.H., Mohammad, R.M. (2008) Efficacy of selected natural products as therapeutic agents against cancer. *J Natl Prod* 71:492–6.
- Barrajón-Catalán, E., Fernández□ Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micol, V. (2011) A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochemical Analysis* 22(4): 303-312.
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., Guillén, E., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., Micol, V. (2010) Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem Toxicol* 48: 2273–2282.
- Bartels, D., Salamini, F. (2001) Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology* 127: 1346-1353.
- 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 Safety* 9(1): 57-81.
- Beck, E.G., Fettig, S., Knake, C., Gartig, K., Bhattarai, T. (2007) Specific and unspecific responses of plant to cold and drought stress. *J Biosci* 32: 501–510.
- Benavente-García, O., Castilho, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Rio, J.A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food chemistry* 68(4): 457-462.
- Beveridge, T., Li, T.S.C., Oomah, B.D., Smith, A. (1999) Sea buckthorn products: manufacture and composition. *J Agric Food Chem* 47: 3480–3488.
- Bewley, J.D., Krochko, J.E. (1982) Desiccation-tolerance. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, Physiological Ecology II* (Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H., Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Vol. 12B, pp. 325-377.

- 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.
- Bijelović, A., Rosić, N., Miljuš-Djukić, J., Ninković, S., Grubišić, D. (2004) *In vitro* regeneration and transformation of *Blackstonia perfoliata*. *Biologia plantarum* 48(3): 333-338.
- Binns, A., Campbell, A. (2001) *Agrobacterium tumefaciens* –mediated transformation of plant cells. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, UK, 1–6.
- Bisio, A., Corallo, A., Gastaldo, P., Romussi, G., Ciarallo, G., Fontana, N., De Tommasi, N., Profumo, P. (1999) Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling grown in Italy. *Annals of Botany* 83: 441-452.
- Blumwald, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol* 12: 431–434.
- Bogdanović, M., Todorović, S., Dragičević, M., Cankar, K., Beekwilder, J., Bouwmeester, H., Simonović, A. (2013) Vector construction for promoter analyses in chicory and fluorescence evaluation by agroinfiltration. XX symposium of the Serbian Plant Physiology Society, 4-7. June 2013, Subotica, Book of Abstracts, 60
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R. (1998) Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4126–4133.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G. (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099–1111.
- 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.
- Bore, E., Langsrud, S., Langsrud, Ø., Rode, T. M., Holck, A. (2007) Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology* 153(7): 2289-2303.

- Boros, B., Jakabova, S., Dornyeia, A., Horvathd, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felinger, A. (2010) Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of chromatography A* 1217: 7972-7980.
- 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.
- Bouamama, H., Villard, J., Benharref, A., Jana, M. (1998) Antibacterial and antifungal activities of *Cistus incanus* and *C. monspeliensis* leaf extracts. *Therapie* 54(6): 731-733.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161 (5): 839-851
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 24 – 54.
- Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Manios, Y., Roxborough, H.E., Schuch, W., Sheehy, P.J.A., Wagner, K.H. (2000) Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 913-938.
- 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.
- Bray, E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2: 48-54.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. (2000) Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry and molecular biology of plants* (Gruissem, W., Buchanan, B., Jones, R., Eds.) American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA, pp: 1158–1249.
- Brayand, F., Moller, B. (2006) Predicting the future burden of cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 63-74.

- Brehm-Stecher, B.F., Johnson, E.A. (2003) Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(10): 3357-3360.
- Brewer, M.S. (2011) Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(4): 221-247.
- Brewer, M.S., Prestat, C. (2002) Consumer attitudes towards issues in food safety. *J Food Safety* 22(2): 67–85.
- Bulgakov, V.P. (2008) Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances* 26: 318 – 324.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology* 94(3): 223-253.
- Byun-McKay, A., Godard, K.A., Toudefallah, M., Martin, D.M., Alfaro, R., King, J., Bohlmann, J., Plant, A.L. (2006) Wound-induced terpene synthase gene expression in Sitka spruce that exhibit resistance or susceptibility to attack by the white pine weevil. *Plant physiology* 140(3): 1009-1021.
- Cadenas, E., Davies, K.J.A. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine* 29: 222-230.
- Campbell, S.A., Close, T.J. (1997) Dehydrins: genes, proteins, and association with phenotypic traits. *New Phytol* 137: 61-74.
- Capecka, E., Mareczek, A., Leja, M. (2005) Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chem* 93: 223-226.
- Carpita, N., Sabularse, D., Montezinos, D., Delmer, D.P. (1979) Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* 205: 1144–1147.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (6): 1914–1920.

- Casanova, E., Trillas, M.I., Moysset, L., Vainstein, A. (2005) Influence of *rol* genes in floriculture. *Biotechnol Adv* 23: 3–39.
- Cassells, A.C., Curry, R.F. (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64: 145–167.
- Castellarin, S.D., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E., Gaspero D. G. (2007) Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell & Environment* 30: 1381–1399.
- Ćetković, G.S., Čanadanović-Brunet, J.M., Djilas, S.M, Tumbas, V.T., Markov, S.L., Cvetković, D.D. (2007) Antioxidant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of *Satureja montana* L. subsp. *kitaibelii* extracts. *Int J Mol Sci* 8: 1013-1027.
- Chahed, K., Oudin, A., Guivarc'h, N., Hamdi, S., Chenieux, J.C., Rideau, M., Clastre, M. (2000) L-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from periwinkle: cDNA identification and induced gene expression in terpenoid indole alkaloid-producing cells. *Plant Physiol Biochem* 38: 559–566.
- Chandra, S., Chandra, R. (2011) Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochem Rev* 10: 371-395.
- Chang, K., Kung, M., Chow, N., Su, S. (2004) Genistein arrests hepatoma cells at G2/M phase: involvement of ATM activation and upregulation of p21waf/cip1 and wee1. *Biochemical Pharmacology* 67: 717-726.
- Chappell, J. (2002) The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Curr Opin Plant Biol* 5: 151–157
- Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R., Saunders, C. (1995) Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? *Plant Physiol* 109: 1337–1343.
- Chaves, N., Escudero, J.C., Gutierrez-Merino, C. (1997) Quantitative variation of flavonoids among individuals of a *Cistus ladanifer* population. *Biochem Syst Ecol* 25: 429–435.

- Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., Pichersky, E. (2011) The family of the terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J* 66: 212–229.
- Chen, L.M., Zhou, X.A., Li, W.B., Chang, W., Zhou, R., Wang, C., Chen, S.L. (2013) Genome-wide transcriptional analysis of two soybean genotypes under dehydration and rehydration conditions. *BMC genomics* 14(1): 687.
- Chen, T.C., Hinton, D.R., Zidovetzki, R., Hofman, F.M. (1998) Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 78(2): 165-174.
- Chen, X.W., Serag, E.S., Sneed, K.B., Zhou, S.F. (2011) Herbal bioactivation, molecular targets and the toxicity relevance. *Chemico-biological interactions* 192(3): 161-176.
- Cheong, Y.H., Chang, H.-S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., Luan, S. (2002) Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* 129: 661–677.
- Chinou, I. (2005) Labdanes of Natural Origin-Biological Activities (1981-2004). *Current Medicinal Chemistry* 12 (11): 1295-1317
- Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., Verbist, F. (1994) Cytotoxic and Antibacterial Labdane- Type Diterpenes from the Aerial Parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Med* 60: 34-36.
- Christensen, B., Müller R. (2009) The use of *Agrobacterium rhizogenes* and its *rol*-genes for quality improvement in ornamentals. *Eur J Hort Sci* 74: 275–287.
- Christey, M.C. (2001) Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 37: 687 – 700.
- Clardy, J., Walsh, C. (2004) Lessons from natural molecules. *Nature* 432: 829-837.

- 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.
- Close, T.J. (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 100: 291–296
- Close, T.J., Fenton, R.D., Moonan, F. (1993) A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Mol Biol* 23: 279–286.
- Cordoba, E., Salmi, M., León, P. (2009) Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants, *J Exp Bot* 60: 2933-2943.
- Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C., Coldea, G. (2011) Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell Tiss Org* 106: 279–288.
- Coughlan, A.P., Piché, Y. (2005) *Cistus incanus* root organ cultures: a valuable tool for studying mycorrhizal associations. In: *In vitro* culture of mycorrhizas Springer Berlin Heidelberg. pp. 235-252.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L. (2001) Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology* 91(3): 492-497.
- Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12(4): 564-582.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000) Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry and molecular biology of plants* (Buchanan, B.B., Grussem, W., Jones, R.L., Eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, pp: 1250–1318
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2006) Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (Crozier, A., Clifford, M.N., Ashi, H., Eds.), Blackwell Publishing Ltd., UK, pp: 1-25.

- Cury-Boaventura, M.F., Pompeia, C., Curi, R. (2005) Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Raji cells. *Nutrition* 21: 395–405
- Czarnota, M.A., Rimando, A.M., Weston, L.A. (2003) Evaluation of seven sorghum (*Sorghum* sp.) accessions. *Journal of Chemical Ecology* 29: 2073–2083.
- Daayf, F., Lattanzio, V. (2008) *Recent Advances in Polyphenol Research*, vol. 1. Blackwell Publishing Ltd.
- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313–7352.
- Dai, Y., Grant, S. (2003) Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology* 3: 362-370.
- Darias, V., Bravo, L., Rabanal, R., Sanchez-Mateo, C. C., Martin-Herrera, D. A. (1990) Cytostatic and antibacterial activity of some compounds isolated from several *Lamiaceae* species from the Canary Islands. *Planta medica* 56(01): 70-72.
- David, R., Carde, J.P. (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 258, 1338-1340.
- Dayan, F.E., Watson, S.B., Nanayakkara, N.D. (2007) Biosynthesis of lipid resorcinols and benzoquinones in isolated secretory plant root hairs. *Journal of experimental botany* 58(12): 3263-3272.
- de Oliveira, A.B., Alencar, N.L.M., Gomes-Filho, E. (2013) Comparison Between the Water and Salt Stress Effects on Plant Growth and Development, Responses of Organisms to Water Stress (Dr. Sener Akinci, Ed.), InTech, <http://www.intechopen.com/books/responses-of-organisms-to-water-stress/comparison-between-the-water-and-salt-stress-effects-on-plant-growth-and-development>
- de Sousa Andrade, L.N., de Lima, T.M., Curi, R., de Lauro Castrucci, A.M. (2005) Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. *Toxicol In Vitro* 19: 553–560.

- Deans, S.G., Noble, R.C., Hiltunen, R., Wuryani, W., Penzes, L.G. (1995) Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. *Flavour and Fragrance Journal* 10(5): 323-328.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74: 101–109.
- Delessert, C., Wilson, I. W., Van Der Straeten, D., Dennis, E.S., Dolferus, R. (2004) Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in *Arabidopsis* leaves. *Plant Molecular Biology* 55: 165–181.
- Demetzos, C., Anastasaki, T., Perdetzoglou, D. (2002) A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in Crete (Greece). *Z Naturforsch* 57c: 89–94.
- Demetzos, C., Dimas, K., Hatziantoniou, S., Anastasaki, T., Angelopoulou, D. (2001) Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cis-clerodane type diterpenes. *Planta medica* 67(7): 614-618.
- Demetzos, C., Dimas, K.S. (2001) Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity, In: *Studies in Natural Products Chemistry* (Atta-ur-Rahman, Ed.), Elsevier science, Oxford, UK, Volume 25, Part F, pp: 235-292
- Demetzos, C., Stahl, B., Anastassaki, T., Gazouli, M., Tzouvelekis, L., Rallis, M. (1999) Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin ladano of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Med* 65: 76–78.
- Demetzos, C., Katerinopoulos, H., Kouvarakis, A., Stratigakis, N., Loukis, A., Ekonomakis, C., Spiliotis, V., Tsaknis, J. (1997) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. *Planta medica* 63(5): 477-479.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Couladis, M., Haruala, C., Kokkinopoulos, D. (1994) Natural Metabolites of ent-13-epi-Manoyl Oxide and Other Cytotoxic Diterpenes from the Resin "LADANO" of *Cistus creticus* *Planta Med* 60: 590-591.

- Demetzos, C.N., Chinou, J.B., Charvala, C.E., Homatidou, V.I. (1990) The essential oil of *Cistus parviflorus* and its antimicrobial activity in comparison with *C. monspeliensis*. *Fitoterapia* 61(5): 439-442.
- Demming-Adams, B., Adams, W.W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1: 21–27.
- Dević, M., Živković, S., Momčilović, I., Kanellis, A.K., Grubišić, D. (2009) Accumulation of dehydrins during dehydration/rehydration cycle in *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. 5th Balkan Botanical Congress, Belgrade, Book of abstracts, 119
- Dewick, P.M. (2002) The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* 19 181–222
- 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.
- Dimas, K., Demetzos, C., Ioannidis, P., Trangas, T. (2001) Labdane type diterpenes down-regulate the expression of c-myc protein but not of Bcl-2 in human leukemia T-cell lines undergoing apoptosis. *Leuk Res* 25: 449–454.
- Dimas, K., Kokkinopoulos, D., Demetzos, C., Vaos, B., Marselos, M., Malamas, M., Tzavaras, T. (1999) The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines. *Leuk Res* 23: 217–234.
- Dimas, K., Demetzos, C., Marsellos, M., Sotiriadou, R., Malamas, M., Kokkinopoulos, D. (1998) Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro. *Planta Med* 64: 208–211.
- Disch, A., Hemmerlin, A., Bach, T.J., Rohmer, M. (1998) Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem J* 331: 615–621.
- Dmitrović, S., Mitić, N., Zdravković-Korać, S., Vinterhalter, B., Ninković, S., Čulafić, L.J. (2010) Hairy roots formation in recalcitrant-to-transform plant *Chenopodium rubrum*. *Biologia plantarum* 54(3): 566-570.

- Doran, P.M. (2009) Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. *Biotechnol Bioeng* 103: 60–76.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308– 316.
- Ellul, P., Boscaiu, M., Vicente, O., Moreno, V., Rosselló, J.A. (2002) Intra- and interspecific variation in DNA content in *Cistus* (*Cistaceae*). *Annals of Botany* 90(3): 345-351.
- Espinel-Ingroff, A. (2001) Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 39:1360-1367.
- Facchini, P. (2001) Alkaloids biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 29-66
- Falara, V., Pichersky, E., Kanellis, A.K. (2010). A Copal-8-ol diphosphate synthase from the angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* is a putative key enzyme for the formation of pharmacologically active, oxygen-containing labdane-type diterpenes. *Plant Physiology* 154: 301–310.
- Falara, V., Fotopoulos, V., Margaritis, T., Anastasaki, T., Pateraki, I., Bosabalidis, Kafetzopoulos, D., Demetzos, C., Pichersky, E., Kanellis, A.K.K. (2008) Transcriptome analysis approaches for the isolation of trichome-specific genes from the medicinal plant *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant molecular biology* 68 (6): 633-651.
- Falk, K.L., Tokuhisa, J.G., Gershenzon, J. (2007) The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biol* 9: 573–581.
- Falk, K.L., Gershenzon, J., Croteau, R. (1990) Metabolism of monoterpenes in cell cultures of common Sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiology* 93: 1559-1567.
- Farjam, M.H., Rustaiyan, A., Ezzatzadeh, E., Jassbi, A.R. (2013) Labdane-Type Diterpene and Two Flavones from *Salvia Sharifii* Rech. f. and Esfan. and their Biological Activities. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 12(2): 395.

- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., Rock, C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15– S45.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2005) Signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological redox homeostasis and antioxidant responses. *The Plant Cell* 17: 1866–1875.
- Freeman, B.C., Beattie, G.A. (2008) An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-I-2008-0226- 01
- Fridman, E., Pichersky, E. (2005) Metabolomics, genomics, proteomics, and the identification of enzymes and their substrates and products. *Current Opinion Plant Biology* 8: 242-248.
- Fullas, F., Hussain, R.A., Chai, H.B., Pezzuto, J.M., Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D. (1994) Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. *Journal of natural products* 57(6): 801-807.
- Funk, C., Lewinsohn, E., Vogel, B.S., Steele, C.L., Croteau, R. (1994) Regulation of oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*) (coordinate induction of monoterpene and diterpene cyclases and two cytochrome P450-dependent diterpenoid hydroxylases by stem wounding). *Plant physiology* 106(3): 999-1005.
- Gallucci, M.N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., Demo, M. (2009) Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and fragrance journal* 24(6): 348-354.
- Gang, D.R., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K.H., Simon, J.E., Lewinsohn, E., Pichersky, E. (2001) An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol* 125: 539–555.
- Gaosheng, H., Jingming, J. (2012) Production of Useful Secondary Metabolites Through Regulation of Biosynthetic Pathway in Cell and Tissue Suspension Culture of Medicinal Plants, *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (Dr. Annarita Leva, Ed.), ISBN: 978-953-51-0787-3, InTech, doi: 10.5772/53038. Available from: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in->

[vitro-culture/production-of-useful-secondary-metabolites-through-regulation-of-biosynthetic-pathway-in-cell-and-ti](#)

- Garbarino, J.A., Fraga, B.M., Hernandez, M.G., Chamy, M.C., Piovano, M. (2001) Chemistry and biotransformations in the *Scrophulariaceae* family. *Pure Appl Chem* 73: 579–582.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F., Dommes, J. (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263-285.
- Gaussen, H., Leroy, J.F., Ozenda, P. (1982) *Précis de Botanique*. Masson, Paris
- Georgiev, V., Ivanov, I., Berkov, S., Ilieva, M. Georgiev, M., Gocheva, T., Pavlov, A. (2012) Galanthamine production by *Leucojum aestivum* L. shoot culture in a modified bubble column bioreactor with internal sections. *Eng Life Sci* 12: 534–543.
- 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.
- Gershenzon, J. (1984) Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: *Phytochemical adaptations to stress*, Springer US, pp. 273-320.
- Ghassemian, M., Lutes, J., Tepperman, J.M., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Quail, P.H., Lange, B.M. (2006) Integrative analysis of transcript and metabolite profiling data sets to evaluate the regulation of biochemical pathways during photomorphogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 448 (1): 45-59.
- Ghobadi, M., Taherabadi, S., Ghobadi, M.-E., Mohammadi, G.-R., Jalali-Honarmand, S. (2013) Antioxidant capacity, photosynthetic characteristics and water relations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in response to drought stress, *Industrial Crops and Products* 50: 29-38.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12): 909-930.

- Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A. (2002) Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73: 83–92.
- Gilroy, S., Jones, D.L. (2000) Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in plant science* 5(2): 56-60.
- Ginsburg, H., Deharo, E. (2011) A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments – an introduction. *Malar J* 10 (Suppl. 1) S1
- Giri, A., Narasu, M. (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol Adv* 18: 1–22.
- Giri, A., Ravindra, S.T., Dhingra, V., Narasu, M.L. (2000) Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Curr Sci* 81: 378–382.
- Giuliani, C., Bini, L.M., Papa, F., Cristalli, G., Sagratini, G., Vittori, S., Lucarini, D., Maggi, F. (2011) Glandular Trichomes and Essential Oil Composition of Endemic *Sideritis italica* (Mill.) Greuter et Burdet from Central Italy. *Chemistry & Biodiversity* 8: 2179-2194.
- Gleadow, R.M., Woodrow, I.E. (2002) Defense chemistry of cyanogenic *Eucalyptus cladocalyx* seedlings is affected by water supply. *Tree Physiol* 22: 939–945.
- Gómez-Galera, S., Pelacho, A.M., Gené, A., Capell, T., Christou, P. (2007) The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants, *Plant Cell Rep* 26: 1689-1715.
- González, C., Carballido, M., Castedo, L. (2003) Synthesis of Polyhydroxycyclohexanes and Relatives from (–)-Quinic Acid. *The Journal of Organic Chemistry* 68 (6): 2248-2255.
- Grassmann, J., Hippeli, S., Elstner, E.F. (2002) Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiol Biochem* 40: 471–478.
- Gravsen, S., Frisvad, C.J., Samson, A.R. (1994) *Microfungi*. Munksgaard, 74-153.
- Graßmann, J. (2005) Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins and Hormones*, 72: 505-535.

- Greuter, W., Burdet, H.M., Long, G. (1984) Med Checklist. A critical inventory of vascular plants of the circum-mediterranean countries. Genève: Conservatoire et jardin botanique de la Ville de Genève.
- 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.
- Grierson, C., Schiefelbein, J. (2002) Root hairs. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 1.
- Guevara-Garcia, A., San Roman, C., Arroyo, A., Cortes, M.E., Gutierrez-Nav,a M.D., Leon, P. (2005) Characterization of the Arabidopsis *clb6* mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Cell* 17: 628–643.
- Gülz, P.G., Herrmann, T., Hangst, K. (1996). Leaf trichomes in the genus *Cistus*. *Flora* 191: 85-104.
- Guo, Z., Wagner, G. (1995) Biosynthesis of labdenediol and sclareol in cellfree extracts from trichomes of *Nicotiana glutinosa*. *Planta* 197: 627–632.
- Guo, Z., Severson, R.F., Wagner, G.J. (1994) Biosynthesis of the diterpene cisabienol in cell-free extracts of tobacco trichomes. *Arch Biochem Biophys* 103: 103–108.
- Gupta, A.K., Kaur, N. (2005) Sugar signalling and gene expresion in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of biosciences* 30(5): 761-776.
- Gutensohn, M., Nagegowda, D.A., Dudareva, N. (2013) Involvement of compartmentalization in monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in plants. In: *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches* (Bach, T.J., Rohmer, M., Eds.), Springer Science+Business Media, New York, pp: 155-171.
- Habibi, Z., Eftekhar, F., Samiee, K., Rustaiyan, A. (2000) Structure and Antibacterial Activity of a New Labdane Diterpenoid from *Salvia linearifolia*. *Journal of natural products* 63(2): 270-271.

- Habtemariam, S., Gray, A.I., Waterman, P.G. (1992) Antibacterial Diterpenes from the Aerial Parts of *Premna oligotricha*. *Planta medica* 58: 109-111.
- Halford, N. G., Hey, S., Jhurreea, D., Laurie, S., McKibbin, R. S. (2003) Metabolic signaling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot* 54: 467-475.
- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141(2): 312-322.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free radicals in biology and medicine* 4.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1999). *Free radicals in biology and medicine*, Vol. 3, pp. 1-543. Oxford: Oxford university press.
- Hamberger, B., Bak, S. (2013) Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20120426.
- Hamberger, B., Bohlmann, J. (2006) Cytochrome P450 mono-oxygenases in conifer genomes: discovery of members of the terpenoid oxygenase superfamily in spruce and pine. *Biochem Soc Trans* 34: 1209–1214.
- Hänel, H., Raether, W. (1988) 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.
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., Masmoudi, K. (2011) Plant dehydrins and stress tolerance: Versatile proteins for complex mechanism. *Plant Signaling & Behavior* 6(10): 1503-1509.
- Hanson, J., Smeekens, S. (2009) Sugar perception and signaling —an update. *Current Opinion in Plant Biology* 12:5 62–567.
- Hara, M., Oki, K., Hoshino, K., Kuboi, T. (2003) Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. *Plant Sci* 164: 259–265.

- Harada, H., Murai, Y. (1996) Micropropagation of *Prunus mume*. Plant cell, tissue and organ culture 46(3): 265-267.
- Harborne, J.B. (1997) Plant secondary metabolism. In: Crawley M.J., ed. Plant ecology, 2th edn. Berlin: Blackwell Publishing, pp. 132-155.
- Harborne, J.B.; Turner, B.L. (1984) Plant Chemosystematics, Academic Press: London, Orlando, San Diego, Austin, N.Y., Toronto, Boston, Sydney, Tokyo
- Harris, J.P., Mantle, P.G. (2001) Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. Phytochemistry 58(5): 709-716.
- Hassan, N.M., El-Bastawisy, Z.M., El-Sayed, A.K., Ebeed, H.T., Nemat Alla, M.M. (2013) Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. Journal of Advanced Research. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.11.004>
- Hatziantoniou, S., Dimas, K., Georgopoulos, A., Sotiriadou, N., Demetzos, C. (2006) Cytotoxic and antitumor activity of liposome-incorporated sclareol against cancer cell lines and human colon cancer xenografts. Pharmacol Res 53: 80–87.
- Havaux, M. (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. Trends Plant Sci 3: 147–151.
- Hazarika, B.N. (2003) Acclimatization of tissue cultured plants. Curr Sci 85: 1704–1712.
- Hdider, C., Desjardins, Y. (1994) Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. Plant Cell Tissue Organ Cult 36: 27–33.
- 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.
- Hegnauer, R. (1964) Chemotaxonomie der Pflanzen. III. Stuttgart, Birkhäuser Verlag Basel.
- Hemmerlin, A., Harwood, J. L., Bach, T. J. (2012) A *raison d'être* for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? Progress in lipid research 51(2): 95-148.

- Hemmerlin, A., Hoeffler, J.F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I.A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., Bach, T.J. (2003) Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in Tobacco Bright Yellow-2 cells. *Journal of Biological Chemistry* 278: 26666–26676.
- Herde, O., Cortes, H.P., Wasternack, C., Willmitzer, L., Fisahn, J. (1999) Electric signaling and Pin2 gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiology* 119: 213–218.
- Hernández, I., Alegre, L., Munné-Bosch, S. (2006) Enhanced oxidation of flavan-3-ols and proanthocyanidin accumulation in water-stressed tea plants. *Phytochemistry* 67:1120-1126.
- Hess, D., Ejeta, G., Butler, L.G. (1992) Selecting sorghum genotypes expressing a quantitative biosynthetic trait that confers resistance to *Striga*. *Phytochemistry* 31: 493–497.
- Hoet, S., Opperdoes, F., Brun, R., Quetin-Leclercq, J. (2004) Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drug. *Nat Prod Rep* 21: 353–364.
- Hohl, M., Schopfer, P. (1991) Water relations of growing maize coleoptiles. Comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiol* 95: 716–722.
- Horwitz, S., Cohen, D., Rao, S., Ringel, I., Shen, H., Yang, C. (1993) Taxol: mechanisms of action and resistance. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 15: 55- 61.
- Hsieh, M.H., Chang, C.Y., Hsu, S.J., Chen, J.J. (2008) Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in *ispD* and *ispE* albino mutants in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 66: 663–673.
- Hsieh, M.H., Goodman, H.M. (2005) The *Arabidopsis* IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiol* 138: 641–653.

- Hu, L., Wang, Z., Du, H., Huang, B. (2010) Differential accumulation of dehydrins in response to water stress for hybrid and common bermudagrass genotypes differing in drought tolerance. *Journal of plant physiology* 167(2): 103-109.
- Hu, Z., Du, M. (2006) Hairy root and its application in plant genetic engineering. *J Integr Plant Biol* 48: 121–127.
- 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.
- Ilieva, M., Pavlov, A. (1997) Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell-suspension culture. *Applied microbiology and biotechnology* 47(6): 683-688.
- Ingram, J., Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 377-403.
- Iriondo, J.M., Moreno, C., Pérez, C. (1995) Micropropagation of 6 rockrose (*Cistus*) species. *HortScience* 30: 1080–1081.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., KaKubar, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoids dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 27: 325–333.
- Janković, T., Krstić, D., Šavikin-Fodulović, K., Menković, N., Grubišić, D. (2000) Xanthone compounds of *Centaureum erythraea* grown in nature and cultured *in vitro*. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 10(1): 23-26.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005) *Modern food microbiology*. (Heldman, D.R. Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901 – 3907.
- Jensen, W.A. (1962) *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco, CA, Freeman.

- Jin, S., Mushke, R., Zhu, H., Tu, L., Lin, Z., Zhang, Y., Zhang, X. (2008) Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Rep* 27: 1303–1316.
- Jo, E.-A., Tewari, R.K., Hahn, E.-J., Paek, K.-Y. (2009) In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96: 307-315.
- John, M., Krohn, K., Flörke, U., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B. (1999) Biologically Active Secondary Metabolites from Fungi. 12.1 Oidiolactones A–F, Labdane Diterpene Derivatives Isolated from *Oidiodendron truncate*. *J. Nat. Prod.* 62 (9): 1218–1221.
- Jovanović, Ž., Rakić, T., Stevanović, B., Radović, S. (2011) Characterization of oxidative and antioxidative events during dehydration and rehydration of resurrection plant *Ramonda nathaliae*. *Plant Growth Regul* 64: 231–240.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 47: 3954–3962
- Kaiser, W.M. (1987) Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum* 7: 142-149.
- Kanno, Y., Otomo, K., Kenmoku, H., Mitsuhashi, W., Yamane, H., Oikawa, H., Toshima, H., Matsuoka, M., Sassa T., Toyomasu, T. (2006) Characterization of a rice gene family encoding type-A diterpene cyclases. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1702–1710.
- Karadeniz, F., Burdulu, H.S., Koca, N., Soyer, Y. (2005) Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turk J Agric For* 29: 297–303
- Karp, G. (1999). *Cell and Molecular Biology* (second edition), Wiley, USA
- Karuppusamy, S. (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of medicinal Plants Research* 3 (13): 1222-1239.

- Kaur, N., Gupta, A.K. (2005). Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Curr Sci* 88(11): 1771-1780.
- Kavanagh, K. (2005) *Fungi. Biology and Applications*. John Wiley and Sons. England.
- Keeling, C.I., Bohlmann, J. (2012) Plant Terpenoids. In: *Natural Products in Chemical Biology* (ed N. Civjan), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Keeling, C.I., Dullat, H.K., Yuen, M., Ralph, S.G., Jancsik, S., Bohlmann, J. (2010) Identification and Functional Characterization of Monofunctional ent-Copalyl Diphosphate and ent-Kaurene Synthases in White Spruce Reveal Different Patterns for Diterpene Synthase Evolution for Primary and Secondary Metabolism in Gymnosperms. *Plant Physiol* 152: 1197–1208.
- Keeling, C.I., Bohlmann, J., (2006) Genes, enzymes, and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New. Phytol.* 170: 657-675.
- Kellogg, E. A. (2001) Root hairs, trichomes and the evolution of genes. *Trends in Plant Science* 6: 550–552.
- Kilb, B., Wietoska, H., Godde, D. (1996) Changes in the expression of photosynthetic genes precede loss of photosynthetic activities and chlorophyll when glucose is supplied to mature spinach leaves. *Plant Sci* 115: 225–235.
- 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.
- Kim, S.I., Choi, H.K, Kim, J.H., Lee, H.S., Hong, S.S. (2001) Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Enzyme Microb Tech* 28: 202–209.
- Kim, S.I., Choi, H.K., Kim, J.H., Lee, H.S., Hong, S.S. (1995) Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Enzyme Microbe Tech* 28: 202-209.

- Kim, Y.B., Kim, S.M., Kang, M.K., Kuzuyama, T., Lee, J.K., Park, S.C., Kim, S.U. (2009) Regulation of resin acid synthesis in *Pinus densiflora* by differential transcription of genes encoding multiple 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase genes. *Tree physiology* 29(5): 737-749.
- Kim, Y., Wyslouzil, B. E., Weathers, P. J. (2002) Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38(1): 1-10.
- Kintzios, E. (2006) Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. *Critical Reviews in Plant Science* 25: 79–113.
- Ko, W.G., Kang, T.H., Lee, S.J., Kim, Y.C., Lee, B.H. (2001) Rotundifuran, a labdane type diterpene from *Vitex rotundifolia*, induces apoptosis in human myeloid leukaemia cells. *Phytotherapy research* 15(6): 535-537.
- Koch, K. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509-540.
- Koepp, A.E., Hezari, M., Zajicek, J., Stofer-Vogel, B., LaFever, R.E., Lewis, N.G., Croteau, R., (1995) Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to taxadiene is the committed step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *J. Biol. Chem.* 270: 8686–8690.
- Korth, K.L., Jaggard, D.A.W., Dixon, R. A. (2000) Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. *Plant J* 23: 507–516.
- Kovačević, N. (2000) *Osnovi farmakognozije*, MJM, Beograd
- Kramer, P.J., Boyer, J.S. (1995) *Water Relations of Plants and Soils*. San Diego: Academic Press.
- 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.

- Kretschmar, F.S., Oliveira, Jr.C.J., Braga, M.R. (2007) Differential sugar uptake by cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43(1): 71-78.
- Krook, J., Vreugdenhil, D., van der Plas, L.H. (2000) Uptake and phosphorylation of glucose and fructose in *Daucus carota* cell suspensions are differently regulated. *Plant Physiology and Biochemistry* 38(7): 603-612.
- Krstić, D., Janković, T., Šavikin-Fodulović, K., Menković, N., Grubišić, D. (2003) Secoiridoids and xanthenes in the shoots and roots of *Centaureum pulchellum* cultured *in vitro*. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 39(2): 203-207.
- Krstić-Milošević, D., Janković, T., Vinterhalter, B., Menković, N., Aljančić, I., Vinterhalter, D. (2013) Influence of carbohydrate source on xanthone content in root cultures of *Gentiana dinarica* Beck. *Plant Growth Regulation* 71(2): 147-155.
- Kwa, S.H., Wee, Y.C., Lim, T.M., Kumar, P.P. (1995) Establishment and physiological analyses of photoautotrophic callus cultures of the fern *Platyserium coronarium* (Koenig) Desv under CO₂ enrichment. *J Exp Bot* 46: 1535–1542.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 680. *Nature* 227: 680-685.
- LaFever, R.E., Stofer-Vogel, B., Croteau, R. (1994) Diterpenoid resin acid biosynthesis in conifers: enzymatic cyclization of geranylgeranyl pyrophosphate to abietadiene, the precursor of abietic acid. *Arch Biochem Biophys* 313: 139-149.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., 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.
- Lange, B.M., Wildung, M.R., Stauber, E.J., Sanchez, C., Pouchnik, D., Croteau, R. (2000) Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(6): 2934-2939.
- Langenheim, J.H. (1994) Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J Chem Ecol* 20: 1223–1280.

- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H.S., Tong, Z., Wang, X., Heifetz, P.B., Gruissem, W., Lange, M. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 100: 6866–6871.
- Leaman, D.J. (2008). Sustainable wild collection of plants - make way for a new standard, Convention on Biological Diversity. In: Health and wealth from Medicinal Aromatic Plants (E. Marshall) FAO Diversification booklet number 17.
- Lefter, D.J., Granger, D.N. (2000) Oxidative stress and cardiac disease. The American Journal of Medicine 109: 315-323.
- Legha, M.R., Prasad, K.V., Singh, S.K., Kaur, C., Arora, A., Kumar, S. (2012) Induction of carotenoid pigments in callus cultures of *Calendula officinalis* L. in response to nitrogen and sucrose levels. In Vitro Cell Dev Biol Plant 48: 99–106.
- León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J. (2001) Wound signalling in plants. Journal of Experimental Botany 52 (354): 1-9.
- Levine, M. (1984) *Escherichia coli* infections. In: Bacterial vaccines (Ed. Germanier, R.) Academic Press, Inc. LTD London, UK
- Levinsohn, E., Gijzen, M., Muzika, R.M., Barton, K., Croteau, R. (1993) Oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*) saplings and mature trees: modulation of this wound response by light and water stresses. Plant Physiol 101: 1021–1028
- Liang, P.H., Ko, T.P., Wang, A.H.J. (2002) Structure, mechanism and function of prenyltransferases. Eur. J. Biochem. 269: 3339–3354.
- Lindinger, W., Hansel, A., Jordan, A. (1998) On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS). Medical applications, food control and environmental research. Int J Mass Spectrom Ion Processes 173: 191–241.
- Liu, C.-Z., Cheng, X.-Y. (2008) Enhancement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in cell cultures of *Cistanche deserticola* by osmotic stress. Plant Cell Rep 27: 357–362.

- Liu, H., Wang, X., Wang, D., Zoua, Z., Lianga, Z. (2011) Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Ind Crop Prod* 33: 84–88.
- Liu, Y., Wang, H., Ye, H.C., Li, G.F. (2005) Advances in the plant isoprenoid synthesis pathway and its metabolic engineering. *J In Biol* 47: 769–82.
- Lois, L.M., Rodriguez-Concepcion, M., Gallego, F., Campos, N., Boronat, A. (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* 22: 503–513.
- Loizzo, M.R., Ben Jemia, M., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F., Tundis, R. (2013) Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 59: 586-594.
- Lopez, C.G., Banowetz, G.M., Peterson, C.J., Kronstad, W.E. (2003) Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *CropSci* 43: 577–582.
- Loreto, F., Förster, A., Dürr, M., Csiky, O., Seufert, G. (1998) On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes. *Plant, Cell & Environment*, 21(1): 101-107.
- Loyola, J., Verdugo, I., González, E., Casaretto, J. A., Ruiz Lara, S. (2012) Plastidic isoprenoid biosynthesis in tomato: physiological and molecular analysis in genotypes resistant and sensitive to drought stress. *Plant Biology* 14(1): 149-156.
- Lupea, A.X., Pop, M., Cacig, S. (2008) Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids from *Ziziphus* and *Hydrangea* extracts. *Rev Chim* 59(3): 309–313.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970) The systematic identification of flavonoids. Springer, Berlin
- Madesis, P., Konstantinidou, E., Tsiftaris, A., Nianiou-Obeidat, I. (2011) Micropropagation and shoot regeneration of *Cistus creticus* ssp. *creticus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1(08): 54-58.

- 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.
- Maeda, H., Dudareva, N. (2012) The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 73–105.
- Maes, K., Vercammen, J., Pham-Tuan, H., Sandra, P., Debergh, P.C. (2001) Critical aspects for the reliable headspace analysis of plants cultivated *in vitro*. *Phytochem Anal* 12: 153–158.
- Maffei, M.E., Gertschb, J., Appendinoc, G. (2011) Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Nat Prod Rep* 28: 1359-1380.
- Mahmoud, S.S., Croteau, R.B. (2002) Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7(8): 366-373.
- Malone, M., Alarcon, J.J. (1995) Only xylem-borne factors can account for systemic wound signalling in the tomato plant. *Planta* 196: 740–746.
- Mann, S.C., Andrews, P.A., Howell, S.B. (1991) Modulation of cis-diamminedichloroplatinum (II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *International journal of cancer* 48(6): 866-872.
- Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., Pang, E. (2012) Abiotic stress responses in plants: present and future. In: *Abiotic stress responses in plants: Metabolism, productivity and sustainability*. (Ahmad, P., Prasad, M.N.V., Eds.) Springer Science + Business Media, LLC, USA, pp: 1-21.
- Manukyan, A. (2011) Effect of growing factors on productivity and quality of lemon catmint, lemon balm and sage under soilless greenhouse production: I. Drought stress. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 5(2): 119-125.
- Manzano, D., Fernandez-Busquets, X., Schaller, H., Gonzalez, V., Boronat, A., Arro, M., Ferrer, A. (2004) The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoform 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta* 219: 982–992.

- Marchese, J.A., Ferreira, J.F., Rehder, V.L., Rodrigues, O. (2010) Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*Artemisia annua* L., *Asteraceae*). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22(1): 1-9.
- Marin, P. (2003) *Biohemijaska i molekularna sistematika biljaka*. NNK Internacional, Beograd.
- Marino, G., Bertazza, G., Magnanini, E., Altan, A.D. (1993) Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 34: 235–244.
- Marino, M., Bersani, C., Comi, G. (2001) Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiacea* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology* 67: 187– 195.
- Marshall, E. (2011) *Health and wealth from Medicinal Aromatic Plants.*, Rural Infrastructure and Agro-Industries Division Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome 2011, FAO Diversification booklet number 17.
- Martin, D.M., Gershenzon, J., Bohlmann, J. (2003) Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant Physiol* 132: 1586–1599.
- Martin, K., Pachathundikandi, S., Zhang, C., Slater, A., Madassery, J. (2006) RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. grande naine and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 188–192.
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A. (2011) Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review, *Biotechnology Advances* 29(3): 365-373.
- Matkowski, A. (2008) Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants—A review. *Biotechnology advances* 26(6): 548-560.
- Matsingou, C., Dimas, K., Demetzos, C. (2006) Design and development of liposomes incorporating a bioactive labdane-type diterpene. *In vitro* growth inhibiting and cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Biomed Pharmacother* 60: 191–199.

- Mehrotra, S., Rahman, L., Kukreja, A.U. (2010) An extensive case study of hairy-root cultures for enhanced secondary-metabolite production through metabolic-pathway engineering. *Biotechnol Appl Biochem* 56: 161–172.
- Meyer, A.D., Tempe, J., Costantino, P. (2000) Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. In: *Plant Microbe Interactions* (Stacy, G., Keen, N.K., Eds.) APS Press, St. Paul, MN, pp: 93 – 139.
- Michel, B.E. (1983) Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology* 72: 66-70.
- Michoux, F., Ahmad, N., McCarthy, J., Nixon, P. J.(2011) Contained and high-level production of recombinant protein in plant chloroplasts using a temporary immersion bioreactor. *Plant Biotech J* 9: 575–584.
- Mišić, D., Šiler, B., Skorić, M., Djurickovic, M.S., Nestorović Živković, J., Jovanović, V., Giba, Z. (2013) Secoiridoid glycosides production by *Centaureum maritimum* (L.) Fritch hairy root cultures in temporary immersion bioreactor. *Process Biochemistry* 48(10): 1587-1591.
- Mišić, D., Ghalawenji, N., Grubišić, D., Konjević, R. (2005a) Micropropagation and reintroduction of *Nepeta rtanjensis*, an endemic and critically endangered perennial of Serbia. *Phyton* 45(1): 9-20.
- Mišić, D., Maksimović, V., Todorović, S., Grubišić, D., Konjević, R. (2005b) Influence of carbohydrate source on *Nepeta rtanjensis* growth, morphogenesis and nepetalactone production *in vitro*. *Isr J Plant Sci* 53: 103–108.
- Miyamoto, K., Matsunaga, T., Koshiura, R., Takagi, K., Sataka, T., Hasegawa, T. (1987) Comparative studies on the combined cytotoxic effect of forskolin with mitomycin C and responsiveness to forskolin in rat ascites hepatoma AH66 cells and AH66F cells. *J Pharmacobiodyn* 10: 346-352.
- Mohamed, M.A.-H., Alsadon, A.A. (2010). Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. *Sci Hort* 123: 295–300.

- Mohammadkhani, N., Heidari, R. (2008) Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turk J Biol* 32: 23–30.
- Momčilović, I., Ristić, Z. (2007) Expression of chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, in two lines of maize with contrasting tolerance to heat stress during early stages of plant development. *Journal of plant physiology* 164(1): 90-99.
- Momčilović, I., Grubišić, D., M., Nešković, M. (2001) Transgenic *Gentiana* species (Gentian) In: *Biotechnology in agriculture and forestry* (Bajaj, Y.P.S., Ed.), *Transgenic crops III*, Vol. 48, Springer-Verlag, pp: 123 – 138.
- Momčilović, I., Grubisić, D., Kojić, M.O., Nesković, M. (1997) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and plant regeneration of four *Gentiana* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50 (1): 1– 6.
- Mourey, A., Canillac, N. (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13: 289– 292.
- Muhammad, I., Mossa, J. S., El Feraly, F. S. (1996) Additional antibacterial diterpenes from the bark of *Juniperus procera*. *Phytotherapy Research* 10(7): 604-607.
- Munné-Bosch, S., Falara, V., Pateraki, I., López-Carbonell, M., Cela, J., Kanellis, A.K. (2009) Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant Mediterranean shrub, *Cistus creticus* exposed to water deficit. *Journal of plant physiology* 166(2): 136-145.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. (2003) Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of *Labiatae* species differing in carnosic acid content. *Plant Physiol* 131: 1816–1825.
- Munné-Bosch, S., Mueller, M., Schwarz, K., Alegre, L. (2001) Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. *Journal of plant physiology* 158(11): 1431-1437.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. (2000) Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210: 139–146.

- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25: 239–250.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nair, H.K., Rao, K.V.K., Aalinkeel, R., Mahajan, S., Chawda, R., Schwartz, S.A. (2004) Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 63–69.
- Nakamura, A., Shimada, H., Masuda, T., Ohta, H., Takamiya, K. (2001) Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stress in tobacco. *FEBS Letters* 506: 61–64.
- 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.
- Nawar, W.F. (1996) Lipids. In: *Food chemistry*. 3rd ed. (Fennema, O., Ed.), New York: Marcel Dekker, Inc., pp: 225–320.
- Neerghen, V., Bahorun, T., Taylor, E., Jen, L., Aruoma, O. (2009) Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention, *Toxicology* 278: 229-24
- Nemoto, T., Cho, E.-M., Okada, A., Okada, K., Otomo, K., Kanno, Y., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Sassa, T., Minami, E., Shibuya, N., Nishiyama, M., Nojiri, H., Yamane, H. (2004) Stemar-13-ene synthase, a diterpene cyclase involved in the biosynthesis of the phytoalexin oryzalexin S in rice. *FEBS Lett* 571:182–186.
- Nešković, M., Konjević, R., Čulafić, Lj. (2003) *Fiziologija biljaka*, NNK-International, Beograd.
- Nessler, C.R. (1994) Metabolic engineering of plant secondary products. *Transgenic Res* 3: 109–115.
- Neto, V.B.P., Otoni, W.C. (2003) Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Sci Hort* 97: 193–202.

- Neumann, K.H., Kumar, A., Imani, J. (2009) Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology: Basics and Application. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Newman, J.D., Chappell, J. (1999) Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 34: 95–106.
- Nguyen, K.T., Arsenault, P.R., Weathers, P.J. (2011) Trichomes+ roots+ ROS= artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47(3): 329-338.
- Nguyen, T., Eshraghi, J., Gonyea, G., Ream, R., Smith, R. (2001) Studies on factors influencing stability and recovery of paclitaxel from suspension media and cultures of *Taxus cuspidata* cv *Densiformis* by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 911: 55–61.
- Nikolić, R., Mitić, N., Ninković, S., Miljuš–Đukić, J., Nešković, M. (2003/2004) Efficient genetic transformation of *Lotus corniculatus* L. and growth of transformed plants in field. *Biologia Plantarum* 47 (1): 137 – 140.
- Nimbal, C.I., Pedersen, J.F., Yerkes, C.N., Weston, L.A., Weller, S.C. (1996) Phytotoxicity and distribution of sorgoleone in grain sorghum germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1343–1347.
- Nishida, R. (2002) Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 47: 57-92.
- Niyogi, K.K., Björkman, O., Grossman, A. (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 1462–14167.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S. (2009) Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research* 59: 365-378.
- Nowak, B., Miczyński, K., Hudy, L. (2004) Sugar uptake and utilisation during adventitious bud differentiation on in vitro leaf explants of ‘Wegierka Zwykła’ plum (*Prunus domestica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76(3): 255-260.

- Nychas, G.J.E. (1995) Natural antimicrobials from plants. In: New Methods of Food Preservation (Gould, G.W. ,Ed.), Blackie Academic and Professional, London, pp. 58– 89.
- Oertly, J.J. (1985) The response of plant cells to different forms of moisture stress. J Plant Physiol 121: 295–300.
- Ogura, K., Koyama, T. (1998) Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. Chem. Rev.: 1263–1276.
- Oh, S.M., Chung, K.H. (2004) Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. Life Sci 74: 1325–1335.
- Oksman-Caldentey, K.-M., Inzé, D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in Plant Science 9 (9): 433-440.
- Oliveira, J., Tavares, R. M., Gerós, H. (2002) Utilization and transport of glucose in *Olea europaea* cell suspensions. Plant and cell physiology 43(12): 1510-1517.
- Olsen, S.J., Bishop, R., Brenner, F.W., Roels, T. H., Bean, N., Tauxe, R.V., Slutsker, L. (2001) The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987–1997. Journal of Infectious Diseases 183(5): 753-761.
- Ono, N.N., Tian L. (2011) The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. Plant Science 180: 439 – 446.
- Opitz, S., Kunert, G., Gershenzon, J. (2008) Increased terpenoid accumulation in cotton (*Gossypium hirsutum*) foliage is a general wound response. Journal of chemical ecology, 34(4): 508-522.
- Ormeno, E., Mew, J.P., Vila, B., Bousquet-Melou, A., Greff, S., Bonin, G., Fernandez, C. (2007) Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emission and plant water potential, Chemosphere 67: 276-284.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T., Rember, W.C. (2003) Resin compounds from the seed cones of three fossil conifer species from the Miocene Clarkia flora, Emerald Creek,

- Idaho, USA, and from related extant species. *Review of Palaeobotany and Palynology* 126 (3-4): 225-241.
- Otto, A., Wilde, V. (2001) Sesqui-, di- and triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers. *Bot. Rev.* 67: 141–238.
- Palevitch, D. (1987) Recent advances in the cultivation of medicinal plants. *Acta Hort* 208: 29-35.
- Paolini, J., Falchi, A., Quilichini, Y., Desjobert, J.M., De Cian, M.C., Varesi, L., Costa, J. (2009) Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochemistry* 70: 1146–1160.
- Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M., Komaitis, M. (2008) Variation of the chemical profile and antioxidant Behavior of *Rosmarinus officinalis* L. And *Salvia fruticosa* Miller Grown in Greece. *J Agr Food Chem* 56: 7254–7264.
- Park, S.H., Pinson, S.R.M., Smith, R.H. (1996) T–DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. *Plant Molecular Biology* 32: 1135–1198.
- Patade, V.Y., Suprasanna, P. (2010) Short-term salt and PEG stresses regulate expression of MicroRNA, miR159 in sugarcane leaves, *Journal of Crop Science and Biotechnology* 13 (3): 177-182.
- Pateraki, I., Andersen-Ranberg, J., Hamberger, B., Heskes, A.M., Martens, H.J., Zerbe, P., Bach, S.S., Møller, B.L.L., Bohlmann, J., Hamberger, B. (2014) Manoyl oxide (13R), the biosynthetic precursor of forskolin, is synthesized in specialized root cork cells in *Coleus forskohlii*. *Plant Physiology* 164 (3): 1222-1236.
- Pateraki, I., Kanellis, A.K. (2010) Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant cell reports* 29(6): 629-641.
- Pateraki, I., Kanellis, A.K. (2008) Isolation and functional analysis of two *Cistus creticus* cDNAs encoding geranylgeranyl diphosphate synthase. *Phytochemistry* 69: 1641–1652.

- Pavaraini, D.P., Pavaraini, S.P., Niehues, M., Lopes, N.P. (2012) Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology* 176: 5-16.
- Payne, G.F., Bringi, V., Prince, C., Shuler, M.L. (1991) The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture. In: *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* (Payne, G.F., Bringi, V., Prince, C., Shuler, M.L., Eds.), pp. 1–10
- Pela, Z., Pentcheva, M., Gerasopoulos, D., Maloupa, E. (2000) In vitro induction of adventitious roots and proliferation of *Cistus creticus* L. plants. *Acta Hort* 541: 317–322.
- Peña-Cortés, H., Willmitzer, L., Sánchez-Serrano, J.J. (1991) Abscisic acid mediates wound induction but not developmental-specific expression of the proteinase inhibitor II gene family. *Plant Cell* 3: 963–972.
- Peñuelas, J., Llusià, J., Asensio, D., Munné-Bosch, S. (2005) Linking isoprene with plant thermotolerance, antioxidants and monoterpene emissions *Plant Cell Environ* 28: 278–286.
- Perić, M., Dmitrović, S., Živković, S., Filipović, B., Skorić, M., Simonović, A., Todorović, S. (2012). In Vitro Growth, Morphogenesis, and Acclimatization of Endangered *Rindera umbellata* (Waldst. & Kit.) Bunge. *HortScience* 47(8): 1123-1128.
- Pero, R.W., Lund, H., Leanderson, T. (2009). Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. *Phytotherapy research* 23(3): 335-346.
- 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.
- Peters, R.J. (2010) Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. *Nat Prod Rep* 27: 1521–1530.
- Phillips, M., Walter, M.H., Ralph, S.G., Dabrowska, P., Luck, K., Urós, E.M., Boland, W., Strack, D., Rodríguez-Concepción, M., Bohlmann, J., Gershenzon, J. (2007)

- Functional identification and differential expression of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol Biol* 65: 243-257.
- Phillipson, J.D. (1990) Plants as source of valuable products. In: Secondary products from plant tissue culture (Charlwood, B.V., Rhodes, M.J.C., Eds.), Clarendon Press, Oxford, UK, pp: 1–21
- Piatkowski, D., Schneider, K., Salamini, F., Bartels, D. (1990) Characterization of five abscisic-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water stress genes. *Plant Physiology* 94: 1682-1688.
- Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042.
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., Plzáková, Š. (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol Plant* 42: 481–497.
- Predieri, S., Rapparini, F. (2007) Terpene emission in tissue culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 91: 87–95.
- Qin, X., Zeevaart, J.A. (1999) The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 15354–15361.
- Quartacci, M.F., Glišić, O., Stevanović, B., Navari-Izzo, F. (2002) Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. *J Exp Bot* 53 (378): 2159-2166.
- Querol, J., Campos, N., Imperial, S., Boronat, A., Rodriguez-Concepcion, M. (2002) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett* 514: 343–346.
- Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A. (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances* 20 (2): 101-153
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6(11): 1720-1731.

- Ramalho, P.S., De Freitas, V.A.P., Macedo, A., Silva, G., Silva, A.M.S. (1999) Volatile components of *Cistus ladanifer* leaves. *Flav Frag J* 14: 300–302.
- Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P., Vijila, H.M. (2007) Listeria-review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 40(1): 4-13.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J. (2007) Rang and Dale's Pharmacology (6th Edition ed.). Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.
- Rani, V., Raina, S.N. (2000) Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 36(5): 319-330.
- Rapparini, F., Baraldi, R., Facini, O. (2001) Seasonal variation of monoterpene emission from *Malus domestica* and *Prunus avium*. *Phytochemistry* 57: 681–687.
- Reddy, K.R.N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H.K., Abel, C.A., Shier, W.T. (2010) An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews* 29(1): 3-26.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. (2009) Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine* 16(2): 79-90.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, Z.H., Zhu, L., Zhang, L. (2003) Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 23: 519–53.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E. (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell* 12(5): 707-719.
- Ribaux, M., O'Rourke, J., Gavillet, S., Moncousin, C. (1995) Carbohydrate absorption during the *in vitro* proliferation of *Malus* EM IX. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux* 30: 103-111.
- Rios, J.L., Recio, M.C. (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology* 100(1): 80-84.

- Ro, D.K., Arimura, G.I., Lau, S.Y., Piers, E., Bohlmann, J. (2005) Loblolly pine abietadienol/abietadienal oxidase PtAO (CYP720B1) is a multifunctional, multisubstrate cytochrome P450 monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8060–8065.
- Robbins, R.J. (2003) Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 2866-2887.
- Robles, C., Garzino, S. (2000) Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. *Phytochemistry* 53: 71–75.
- Rojas, M.C., Brewer, M.S. (2008) Consumer attitudes towards issues in food safety. *J Food Saf* 28(1): 1–22.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 675-709.
- Rolland, F., Moore, B., Sheen, J. (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell Online* 14(suppl 1): S185-S205.
- Rorat, T. (2006) Plant dehydrins—tissue location, structure and function. *Cellular & molecular biology letters* 11(4): 536-556.
- Rorat, T., Grygorowicz, W.J., Irzykowski, W., Rey, P. (2004) Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta* 218: 878- 885.
- Roussis, V., Tsoukatou, M., Chinou, I.B., Oritz, A. (1998) Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Helichrysum rupestre* and *H. ambiguum* growing in the Balearic Islands (Part III). *Planta medica* 64(7): 675-676.
- Ruzicka, L. (1953) The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* 9 (10): 357
- Ryan, C.A. (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* 1477: 112–121.

- Saito, K., Yamazaki, M., Murakoshi, I. (1992). Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. *Journal of natural products* 55(2): 149-162.
- Sakagami, Y., Kajimura, K. (2002) Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Hospital Infection* 50(2): 140-4.
- Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G. K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M. (2004) An Overview of Gibberellin Metabolism Enzyme Genes and Their Related Mutants in Rice. *Plant Physiol* 134: 1642–1653.
- Sallaud, C., Giacalone, C., Töpfer, R., Goepfert, S., Bakaher, N., Rösti, S., Tissier, A. (2012) Characterization of two genes for the biosynthesis of the labdane diterpene Z-abienol in tobacco (*Nicotiana tabacum*) glandular trichomes. *The Plant Journal* 72:, 1–17.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., Sangwan, R.S. (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34(1): 3-21.
- Santagati, N.A., Salerno, L., Attaguile, G., Savoca, F., Ronsisvalle, G. (2008) Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in cistus species extracts by HPLC with diode array detection. *Journal of chromatographic science* 46(2): 150-156.
- Santiesteban-López, A., Palou, E., López-Malo, A. (2007) Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. *Journal of applied microbiology* 102(2): 486-497.
- Saracini, E., Tattini, M., Traversi, M.L., Vincieri, F.F., Pinelli, P. (2005) Simultaneous LC–DAD and LC–MS determination of ellagitannins, flavonoid glycosides, and acyl–glycosyl flavonoids in *Cistus salvifolius* L. leaves. *Chromatographia* 62: 245– 249.
- Sasaki, K., Saito, T., Lämsä, M., Oksman-Caltendey, K.-M., Suzuki, M., Ohyama, K., Muranaka, T., Ohara, K., Yazaki, K. (2007) Plants utilize isoprene emission as a thermotolerance mechanism. *Plant and Cell Physiology* 48: 1254-1262.

- Savoia, D. (2012) Plant-Derived Antimicrobial Compounds-Alternatives to Antibiotics. *Future Microbiol* 7(8): 979-990.
- Sawai, S., Saito, K. (2011) Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Frontiers in Plant Science* 2(25): 1-8
- Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 12: 3875–3883.
- Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Hülskamp, M. (2002) TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in Arabidopsis. *The EMBO Journal* 21(19): 5036-5046.
- Schepmann, H.G., Pang, J., Matsuda, S.P. (2001) Cloning and characterization of *Ginkgo biloba* levopimaradiene synthase, which catalyzes the first committed step in ginkgolide biosynthesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392 (2): 263-269.
- Schuhr, C.A., Radykewicz, T., Sagner, S., Latzel, C., Zenk, M.H., Arigoni, D., Bacher, A., Rohdich, F., Eisenreich, W. (2003) Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochem Rev* 2: 3–16.
- Selmar, D., Kleinwächter, M. (2013a) Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Ind Crop Prod* 42: 558–566.
- Selmar, D., Kleinwächter, M. (2013b) Stress Enhances the Synthesis of Secondary Plant Products: The Impact of Stress-Related Over-Reduction on the Accumulation of Natural Products. *Plant Cell Physiol.* 54(6): 817–826.
- Selmar, D. (2008) Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. *Landbauforsch Volk* 58: 139–144.
- Seo, S., Seto, H., Koshino, H., Yoshida, S., Ohashi, Y. (2003) A diterpene as an endogenous signal for the activation of defense responses to infection with tobacco mosaic virus and wounding in tobacco. *Plant Cell* 15: 863–873.

- Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L., Ciarallo, G. (1997) Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of essential oil. *Annals of Botany* 79: 329-336.
- Sfikas, G. (1987) Wild flowers of Crete. Efstathiadis group, Athens, Greece
- Sgherri, C., Stevanović, B., Navari-Izzo, F. (2004) Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum* 122: 478-485.
- 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.
- Sharkey, T.D. (2005) Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant Cell Environ* 28: 269–277.
- Shelef, L.A. (1983) Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 6: 29– 44.
- Shen, W.H., Petit, A., Guern, J., Tempé, J. (1988) Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 85: 3417 – 3421.
- Sherwin, H.W., Farrant, J.M. (1996) Rehydration of three desiccation-tolerant species. *Annals of Botany*, 78: 703-710.
- Shirley, B.W. (1996) Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. *Trends in Plant Sciences* 1: 377–382.
- Siebert, D.J. (2004) Localization of salvinorin A and related compounds in glandular trichomes of the psychoactive sage, *Salvia divinorum*, *Annals of Botany* 93 (6): 763-771.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269 (11): 8022–8028.

- Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A. (2010) Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* 16(3): 402-413.
- Simonović, A. (2011) *Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka*. NNK Internacional, Beograd
- Singh, J., Tiwari, K.N. (2010) High-frequency in vitro multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L. – a valuable medicinal plant. *Ind Crop Prod* 32: 534–538.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144–158.
- Sinkar, V.P., Pythoud, F., White, F.F., Nester, E.W., Gordon, M.P. (1988) *rolA* locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants. *Genes and Development* 2 (6): 688 – 697.
- Skaltsa, H.D., Lazari, D.M., Chinou, I.B., Loukis, A.E. (1999) Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Stachys candida* and *S. chrysantha* from southern Greece. *Planta medica* 65(03): 255-256.
- Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G.-J.E. (2001) Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science* 13(1): 65– 75.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107–1112.
- Skiver, K., Mundy, J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503-512; PMID:2152172.
- Skorić, M., Todorović, S., Ristić, M., Soković, M., Glamočlija, J., Živković, S., Stojić, A., Puač, N., Kanellis, A.K. (2013a) *In vitro* culture of *Cistus creticus* subsp. *creticus* – a source of biological active compounds. 11th International meeting on Biosynthesis, Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms –TERPNET 2013, June 1-5, Kolymvari, Crete, Greece, Book of Abstracts, 133.

- Skorić, M., Nestorović Živković, J., Ristić, M., Stojić, A., Puač, N., Kanellis, A.K., Todorović, S. (2013b) PTR-MS and GC/MS analysis of volatile compounds in shoots cultures of *Cistus creticus* subsp. *creticus*. 1st International Conference on Plant Biology and 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, June 4-7, Subotica, Srbija, Book of Abstracts, 107.
- Skorić, M., Todorović, S., Gligorijević, N., Janković, R., Živković, S., Ristić, M., Radulović, S. (2012) Cytotoxic activity of ethanol extracts of *in vitro* grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Industrial Crops and Products* 38: 153-159.
- Slater, A., Scott, N.W., Fowler, M.R. (2008) Strategies for engineering stress tolerance. In: *Plant Biotechnology, The genetic manipulations of plants*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 212-236.
- Slater, A., Scott, N.W., Fowler, M.R. (2004) *Plant Biotechnology. The Genetic Manipulation of Plants*. Oxford University Press, New York, 35 – 52
- Ślesak, H., Skoczowski, A., Przywara, L. (2004) Exogenous carbohydrate utilisation by explants of *Brassica napus* cultured *in vitro*. *Plant cell, tissue and organ culture* 79(1): 45-51.
- Smeeckens, S., Ma, J., Hanson, J., Rolland, F. (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 274–279.
- Smeeckens, S. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 49–81.
- Smirnov, N. (2005) Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and function. In: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (Smirnov, N., Ed.), Blackwell Publishing Ltd., UK, pp: 53–86.
- Smith, K., Neafie, R., Yeager, J., Skelton, H. (1999) *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. *British Journal of Dermatology* 141(3): 558–561.
- 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.

- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A., Perata P. (2006) Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140: 637–646.
- Soliz-Guerrero, J.B., de Rodriguez, D.J., Rodriguez- Garcia, R., Angulo-Sanchez, J.L., Mendez-Padilla, G. (2002) Quinoasaponins: concentration and composition analysis. In: *Trends in New Crops and New Uses* (Janick J, Whipkey A, Eds.). Alexandria: ASHS Press
- 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.
- Srivastava, S., Srivastava, A.K. (2007) Hairy Root Culture for Mass Production of High-Value Secondary Metabolites. *Crit Rev Biotechnol* 27: 29–43.
- Stanzel, M., Sjolund, R.D., Komor, E. (1988) Transport of glucose, fructose and sucrose by *Streptanthus tortuosus* suspension cells. II. Uptake at high concentrations. *Planta* 174: 210–216.
- Steeghs, M., Bais, H.P., Gouw, J., Goldan, P., Kuster, W., Northway, M., Fall, R., Vivanco, J.M. (2004) Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry as a New Tool for Real Time Analysis of Root-Secreted Volatile Organic Compounds in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135: 47–58.
- Steele, C.L., Katoh, S., Bohlmann, J., Croteau, R. (1998) Regulation of Oleoresinosis in Grand Fir (*Abies grandis*) Differential Transcriptional Control of Monoterpene, Sesquiterpene, and Diterpene Synthase Genes in Response to Wounding. *Plant physiology* 116(4): 1497-1504.
- Steingroewer, J., Bley, T., Georgiev, V., Ivanov, I., Lenk, F., Marchev, A., Pavlov, A. (2013) Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems. *Eng Life Sci* 13: 26–38.
- Stofer Vogel, B., Wildung, M.R., Vogel G., Croteau, R. (1996) Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*): cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase involved in resin acid biosynthesis. *J Biol Chem* 271: 23262–23268.

- Subotić, A., Budimir, S., Grubišić, D., Momčilović I. (2003) Direct regeneration of shoots from hairy root cultures of *Centaurium erythraea* inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. *Biology of Plants* 47: 617–619
- Sudha, G., Ravishankar, G.A. (2003) Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and involvement of calcium channel modulators. *Curr Sci* 84: 775-9.
- Sugden, C., Crawford, R.M., Halford, N.G., Hardie, D.G. (1999) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J* 19: 433-439.
- Sunkar, R., Zhu, J.K. (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2001-2019.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010) *Plant Physiology*, Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, USA
- Talib, W.H. (2011) *Anticancer and Antimicrobial Potential of Plant-Derived Natural Products, Phytochemicals - Bioactivities and Impact on Health* (Prof. Iraj Rasooli, Ed.), ISBN: 978-953-307-424-5, InTech, <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-bioactivities-and-impact-onhealth/anticancer-and-antimicrobial-potential-of-plant-derived-natural-products>
- Tang, D., Ishii, K., Ohba, K. (1996) *In vitro* regeneration of *Alnus cremastogyne* Burk from epicotyl explants. *Plant cell reports* 15(9): 658-661.
- Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiod, 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.
- Tepfer, M., Casse–Delbart, F. (1987) *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiological Science* 4: 24–28.
- Tepfer, D. (1983) The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. In: *Molecular genetics of the bacteria–plant interaction* (Pühler, A., Ed.), Springer–Verlag, Berlin, Heidelberg, pp: 248 – 258.

- Terryn, N., Van Montagu, M, Inzé, D., Goosens, A. (2006) Functional genomic approaches to study and engineer secondary metabolites in plant cell cultures. In: Medicinal and aromatic plants (Bogers, L.J., Craker, L.E., Jange, D., Eds). Springer, The Netherlands, pp: 291–300.
- Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Rose, U.S.R., Schnitzler, J.P. (2006) Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant J* 45: 540–560.
- Tholl, D., Lee, S. (2011) Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists 9. doi: 10.1199/tab.0143
- Threlfall, D.R., Whitehead, I.M. (1991) Terpenoid phytoalexins: aspects of biosynthesis, catabolism and regulation. In: Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. (Harborne, J.B., Tomas-Barberan, F.A., Eds.), Clarendon Press, Oxford, UK, pp. 159–208.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Chen, Y., Wang, Y. (2012) The Mechanism of Antifungal Action of Essential Oil from Dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLoS ONE* 7(1): e30147.
- Tiwari, R.K., Trivedi, M., Guang ,Z.C., Guo, G.Q., Zheng G.C. (2007) Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicoside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Reports* 26: 199 – 210.
- Todorović, S., Grubišić, D., Giba, Z., Mišić, D., Konjević, R. (2006) Sucrose effects on *in vitro* fruiting and seed production of *Centaurium pulchellum*. *Biol Plant* 50: 771–774.
- Toki, M., Ooi, T., Kusumi, T. (1999) Sesterterpenoids and Diterpenoids of the Wax Excreted by a Scale Insect, *Ceroplastes pseudoceriferus*. *J. Nat. Prod.* 62 (11):1504–1509.
- Tomás-Menor, L., Morales-Soto, A., Barrajón-Catalán, E., Roldán-Segura, C., Segura-Carretero, A., Micol, V. (2013). Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food and Chemical Toxicology* 55: 313-322.

- Trapp, S.C., Croteau, R.B. (2001a) Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* 158: 811–832.
- Trapp, S., Croteau, R. (2001b) Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 689-724.
- 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.
- Ulrich-Merzenich, G., Panek, D., Zeitler, H., Vetter, H., Wagner, H. (2010) Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. *Indian Journal of Experimental Biology* 48(3): 208-219.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S., Bozok-Johansson, C. (1994) Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry* 36(4): 971-974.
- Ulubelen, A., Miski, M., Johansson, C., Lee, E., Mabry, T. J., Matlin, S. A. (1985) Terpenoids from *Salvia palaestina*. *Phytochemistry* 24(6): 1386-1387.
- Unai, E., Iselen, T., de Garcia, E. (2004) Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp.) from the somaclone CIEN BTA-03 and its parental clone Williams. *Fruits* 59: 257–263.
- Uosukainen, M., Vasara, T. (1995) Effect of autoclaving on tissue culture medium. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux* 30: 9-20
- van der Weele, C.M., Spollen, W.G., Sharp, R.E., Baskin, T.I. (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J Exp Bot* 51: 1555–1562.
- Van Gorsel, H., Li, C., Kerbel, E.L., Smits, M., Kadar, A.A. (1992) Composition characterization of prune juice. *J Agric Food Chem* 40: 784–789.
- Van Huylenbroeck, J.M., Debergh, P.C. (2000) Monitoring quality of micropropagated plants during acclimatization. *Acta Hort* 517: 65–72.

- van Leeuwen, W., Ruttink, T., Borst Vreessen, A.W., van der Plas, L.H., van der Krol, A.R. (2001) Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *Journal of Experimental Botany* 52(358): 949-959.
- Vázquez-Flota, F., Hernández-Domínguez, E., de Lourdes Miranda-Ham, M., Monforte-González, M. (2009) A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus in vitro* cultures. *Biotechnol Lett* 31: 591–595.
- Veena, V., Taylor, C.G. (2007) *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 43: 383 – 403.
- Veerasham, C. (2004) *Medicinal Plant Biotechnology*. CBS Pub., New Delhi, pp: 377–419.
- Velikova, V., Edreva, A., Loreto, F. (2005) Endogenous isoprene protects *Phragmites australis* leaves against singlet oxygen. *Plant Cell Environ* 28: 318–327.
- Veljović-Jovanović, S., Kukavica, B., Navari-Izzo, F. (2008) Characterization of polyphenol oxidase changes induced by desiccation of *Ramonda serbica* leaves. *Physiol Plant* 132: 407–416.
- Veljović-Jovanović, S., Kukavica, B., Stevanović, B., Navari-Izzo, F. (2006) Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *J Exp Bot* 57: 1759–1768.
- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J. (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1: 13–25.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J.K. (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45: 523-539.
- Verslues, P.E., Bray, E.A. (2004) LWR1 and LWR2 are required for osmoregulation and osmotic adjustment in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136: 2831–2842.

- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M., Schell, J. (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *Journal of General Virology* 26(1): 33-48.
- Vinterhalter, B., Ninković, S., Cingel, A., Vinterhalter, D. (2006) Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. *Biologia plantarum* 50(4): 767-770.
- Vinterhalter, B., Orbović, V., Vinterhalter, D. (1999) Transgenic root cultures of *Gentiana punctata* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 68(4): 275–280.
- Vinterhalter, D., Vinterhalter, B. (1996) *Kultura in vitro i mikropropagacija biljka*. Axial, Beograd
- Vujičić, M., Sabovljević, A., Sabovljević, M. (2014) *Praktikum iz fiziologije rastenja i razvića biljaka*. NKK International, Beograd
- Vivanco, J.M., Baluška, F. (2012) *Secretions and Exudates in Biological Systems* (Vol. 12). Springer.
- Vranová, E., Coman, D., Gruissem, W. (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol.*64: 665-700.
- Wagner, G.J., Wang, E., Shepherd, R.W. (2004) New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93: 3-11.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R. (2007) Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany* 61(3): 199-223.
- Wang, Q., Hillwig, M.L., Peters, R.J. (2011) CYP99A3: functional identification of a diterpene oxidase from the momilactone biosynthetic gene cluster in rice. *Plant J* 65: 87–95.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218 (1): 1-14.
- Wang, Y., Wang, F., Zhai, H., Liu, Q. (2007) Production of a useful mutant by chronic irradiation in sweetpotato. *Sci Hort* 111: 173–178.

- Wang, Y.Y., Weathers, P.J. (2007) Sugars proportionately affect artemisinin production. *Plant Cell Rep* 26: 1073–1081.
- Warburg, E.F. (1968) *Cistus* L. In: *Flora Europaea* (Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., Eds). Volume 2. Cambridge: Cambridge University Press, 282
- Warneke, C., de Gouw, J., Kuster, Goldan, P., Fall, R. (2003) Validation of atmospheric VOC measurements by proton transfer- reaction mass spectrometry using gas-chromatographic pre-separation method. *Environ Sci Technol* 37: 2494–2501.
- Weathers, P.J., Towler, M.J., Xu, J.F. (2010) Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1339–1351.
- Weathers, P.J., Cheetham, R.D., Follansbee, E., Teoh, T. (1994) Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*. *Biotechnol Lett* 16: 1281–1286.
- Welander, M., Welander, N.T., Brackman, A.S. (1989) Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. *J Hort Sci* 64: 361–366.
- Wenkart, S., Roth-Bejerano, N., Mills, D., Kagan-Zur, V. (2001) Mycorrhizal associations between *Tuber melanosporum* mycelia and transformed roots of *Cistus incanus*. *Plant Cell Reports* 20(4): 369-373.
- Werker, E. (2000) Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research* 31: 1–35.
- Westh, H., Zinn, C.S., Rosdahl, V.T., Sarisa Study Group (2004) An international multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries. *Microbial Drug Resistance* 10: 169-176.
- Wichi, H.C. (1986) Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food and Chemical Toxicology* 24: 1127-1130.
- Wildon, D.C., Thain, J.F., Minchin, P.E.H., Gubb, R.I., Reilly, A.J., Skipper, Y.D., Doherty, H.M., O'Donnell, P.J., Bowles, D.J. (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360: 62-65.

- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 105(3): 940–949
- Woo, H.H., Jeong, B., Rand Hawes, M.C. (2005) Flavonoids: From cell cycle regulation to biotechnology. *Biotechnol Lett* 27: 365–374.
- Wright, G.D. (2010) Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current opinion in microbiology* 13(5): 589-594.
- 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.
- Xu, J., Liu, X., Zhou, S., Wei, M. (2009) Combination of immunotherapy with anaerobic bacteria for immunogene therapy of solid tumours. *Gene Therapy and Molecular Biology* 13: 36-52.
- Xu, T., Tripathi, S. K., Feng, Q., Lorenz, M. C., Wright, M. A., Jacob, M. R., Agarwal, A. K. (2012) A potent plant-derived antifungal acetylenic acid mediates its activity by interfering with fatty acid homeostasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56(6): 2894-2907.
- Xu, Z., Zhou, G., Shimizu, H. (2010) Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signal Behav* 5(6): 649-654.
- Yadav, R.K., Sangwan, R.S., Sabir, F., Srivastava, A.K., Sangwan, N.S. (2014) Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 74: 70-83.
- Yang, Z., Park, H., Lacy, G.H., Cramer, C.L. (1991) Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes by wounding and pathogen challenge. *The Plant Cell Online* 3(4): 397-405.
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., Hafiz, I.A. (2013) Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular biology reports* 40 (4): 2837-2849.

- Yu, X., Reed, B.M. (1993). Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) *in vitro* using glucose as a carbon source. *Plant Cell Report* 12: 256–259.
- Zaretsky, M., Kagan-Zur, V., Mills, D., Roth-Bejerano, N. (2006) Analysis of mycorrhizal associations formed by *Cistus incanus* transformed root clones with *Terfezia boudieri* isolates. *Plant cell reports* 25(1): 62-70.
- Zdero, C., Bohlmann, F., King, R.M. (1991) *Phytochemistry* 30: 2991-3000.
- Zdero, C., Bohlmann, F., Niemeyer, H.M. (1990) *Phytochemistry* 29: 326-329.
- Zdravković-Korać, S., Druart, P., Muhovski Y., Čalić, D., Radojević, Lj. (2004) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer to *Aesculus hippocastanum* L. and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Rep* 22: 698-704.
- Zenk, M.H. (1991) Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cultures as a pot of gold. *Phytochemistry* 30: 3861–3863
- Zheng, W., Wang, Y. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Food Chem* 49: 5165–5170
- Zhou, X., Sun, Y., Cao, G., Li, W., Lin, R. (1994) A rapid and efficient DNA extraction method of genus *Fagopyrum* for RAPD analysis. In: Javornik B, Bohanec B, Kreft I (eds): Proceedings of the international colloquim on impact of plant biotechnology on agriculture. Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenija, pp. 171-175.
- Zhu, J.K. (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol* 4: 401–406.
- Zinov'eva, V.N., Spasov, A.A. (2011) Mechanisms of plant polyphenols anti-cancer effects. I. Blockade of carcinogenesis initiation. *Biomeditsinskaia khimiia* 58(2): 160-175.
- 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*). *Ind Crop Prod* 32: 580–587.

Zwenger, S., Basu, C. (2008) Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 3(1): 1-7

Zygomala, A.M., Ioannidis, C., Koropouli, X. (2003) *In vitro* propagation of *Cistus creticus* L. *Acta Hort* 616: 391–396.

BIOGRAFIJA AUTORA

Mr Marijana V. Skorić (rođ. Dević) rođena je 10. aprila 1974. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i Prvu beogradsku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 1993/94 godine. Diplomirala je 2000. godine i stekla zvanje diplomiranog molekularnog biologa i fiziologa. Magistar bioloških nauka je postala 2005. godine uspešno odbranivši magistarsku tezu pod naslovom „Klijanje semena *Arabidopsis thaliana* indukovano aktivacijom fitohroma A i fitohroma B“ pod mentorstvom i neposrednim rukovodstvom prof. dr Dragoljuba Grubišića. Mr Marijana Skorić je zaposlena od 2001. godine kao istraživač-pripravnik, a od 2005. kao istraživač-saradnik na Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Nakon pauze tokom 2007/2008 godine, od 2009. godine radi kao istraživač-saradnik na istom mestu.

Trenutno mr Marijana Skorić je angažovana na dva nacionalna projekta: „Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju *ex situ* zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja“ (ON173024) i „Primena niskotemperaturnih plazmi u biomedicini, zaštiti čovekove okoline i nanotehnologijama“ (III41011). U prethodnom periodu mr Marijana Skorić je učestvovala u realizaciji pet nacionalnih projekata. Takođe mr Marijana Skorić je bila angažovana i na međunarodnim projektima: „Plant Terpenoids for Human Health: a chemical and genomic approach to identify and produce bioactive compounds“ (FP7 - Grant Agreement No. 227448; 2009-2013), „Depozicija atmosferskih polutanata u mahovinama: teški metali, azot i PAH“ (bilateralni projekat R Srbija - Slovenija, 2012-2013), kao i u realizaciji istraživanja pod naslovom „Molecular Analysis of Black Poplar (*Populus nigra* L.) Population Variability using Molecular Markers“ u okviru međunarodnog projekta Service Contract No. SEE/D/0165/2.3/X-02.

Mr Marijana Skorić je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije i Evropskog društva za biljnu biologiju (FESPB).