

Broj 2 • septembar 2022. N° 2 • September 2022.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**
Trends in **Molecular Biology**



Beogradska škola molekularne biologije
Belgrade School of Molecular Biology



Beograd • Belgrade • 2022.
IMGGI • IMGGE

Pedesetogodišnjica osnivanja studijskog programa molekularna biologija i fiziologija Gordana Matić	8	50th anniversary of the molecular biology and physiology study program
TRPV1: Ciljno mesto dejstva lekova u terapiji različitih stanja Branislava Medić Brkić, Katarina Savić Vujović, Dragana Srebro, Sonja Vučković	15	TRPV1: A Promising drug target for the treatment of various conditions
Geni-modifikatori β -talasemijskih sindroma – novi terapijski pristupi Milena Ugrin	32	Gene modifiers in β -thalassemia syndromes – a new therapy approach
Novi uvid u genetiku naslednih perifernih neuropatija Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dusan Keckarević	51	Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics
Savremeni pristupi u istraživanju molekularne osnove karcinoma prostate Zorana Dobrijević, Suzana Matijašević-Joković, Ana Branković, Ana Djordjević, Milica Popović i Goran Brajušković	62	Modern approaches in research of the molecular basis of prostate cancer
Uticaj tumorske mikrosredine na razvoj i progresiju maligniteta Ilona Đorić, Tijana Išić Denčić, Sonja Selemetjev	75	The effects of tumor microenvironment on malignancy formation and progression
Uloga hsa-miR-93-5p u kolorektalnom karcinomu Jovana Despotović	90	Role of hsa-miR-93-5p in colorectal cancer Jovana Despotović
Antitumorski potencijal novih derivata steroidnih hidrazona Marijana B. Živković	104	Antitumor potential of new steroidal hydrazone derivatives
Molekularna dijagnostika glioblastoma – klinički uticaji <i>IDH</i> mutacija i epigenetičkog utišavanja aktivnosti <i>MGMT</i> gena Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović	125	Molecular diagnostics of glioblastoma – clinical impact of <i>IDH</i> mutations and epigenetic silencing of <i>MGMT</i>
Molekularni profil timoma Jelena Perić	143	Molecular profile of thymoma
Ekspresija i funkcija insulina u centralnom nervnom sistemu Tamara Dakić, Predrag Vujović	156	Insulin expression and action in the central nervous system
Neuroprotektivni potencijal progesterona Ivana Guševac Stojanović, Dunja Drakulić	168	Neuroprotective progesterone potential
Uloga dehidroepiandrosterona u moždanoj ishemiji/reperfuziji Marina Zarić Kontić, Jelena Martinović	186	Effect of dehydroepiandrosterone on cerebral ischemia/reperfusion
Hemijski profil i antioksidativna aktivnost crvenih vina klonova autohtone i internacionalnih sorti vinove loze Neda Đorđević	206	Chemical profile and antioxidative activity of red wines obtained from autochthonous and international grape clone varieties
Dihidrochalkoni jabuke florizin i floretin kao nove alelopatske supstance Mariana Stanišić, Slavica Ninković, Nevena Banjac	223	Apple dihydrochalcones phloridzin and phloretin as novel allelochemicals
Dosadašnja postignuća na promeni boje cvetova biljaka metaboličkom modulacijom biosinteze karotenoida Milena Trajković, Sladjana Jevremović, Aleksandar Cingel	238	Recent advances in flower color alteration by metabolic manipulation of carotenoid biosynthesis
Bioinformatički alati za analizu mikroRNK Katarina Zeljić	255	Bioinformatics tools for the analysis of microRNA
Marker porekla kao adut u forenzičkim analizama DNK u kompleksnim slučajevima iz perspektive Y hromozoma Miljana Kecmanović, Milica Keckarević Marković, Dušan Keckarević	275	Lineage marker as a key player in complex forensic cases from the perspective of Y chromosome

Dihidrohalkoni jabuke florizin i floretin kao nove alelopatske supstance

Mariana Stanišić, Slavica Ninković, Nevena Banjac

Odeljenje za fiziologiju biljaka, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu.

Kontakt: mariana.stanasic@ibiss.bg.ac.rs

Apstrakt

Sekundarni metaboliti jabuke (*Malus × domestica* Borkh.) florizin i floretin su dihidrohalkoni visoko specifični za vrste roda *Malus*. Autoalelopatski potencijal ovih fenolnih jedinjenja se ogleda u suzbijanju rasta klijanca i sadnica zasađenih na mestu prvobitnih voćnjaka jabuke. U osnovi njihove fitotoksičnosti su ultrastrukturne i molekularne promene koje se ogledaju u povećanju sadržaja malondialdehida, prolina i aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid-dismutaze, peroksidaza i katalaza, kao i nivoa ekspresije proteina uključenih u odbrambene mehanizme ćelije. Najnovija istraživanja ukazuju na fitotoksičnost ovih dihidrohalkona i prema drugim biljnim vrstama, kao npr. korovskoj model biljci *Arabidopsis thaliana*. Tretman floretinom izaziva značajnu inhibiciju raste i razvika klijanaca *A. thaliana*, poremećaj gravitropskog odgovora i pojavu morfoloških i ultrastrukturnih malformacija u čijoj osnovi leži promena ekspresije *CDKA1;1*, *CDKB2;1*, *CYCA3;1* i *CYCB2;4* gena ćelijskog ciklusa, kao i gena uključenih u održanje homeostaze auksina (*PINs*, *AUX1*, *LAX3*, *ABCs*, *TAA1* i *YUCs*) i biosinteze giberelina (*GA20ox2* i *GA3ox1*). Ovo otvara mogućnost za dalja istraživanja njihovog alelopatskog delovanja ali i potencijalnu primenu kao ekološki bezbednih bioherbicida.

Ključne reči: alelopatija, dihidrohalkoni, fenolna jedinjenja, floretin, florizin, jabuka (*Malus × domestica* Borkh.)

Apple dihydrochalcones phloridzin and phloretin as novel allelochemicals

Mariana Stanišić, Slavica Ninković, Nevena Banjac

Institute for Biological Research 'Siniša Stanković' - National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade

Correspondence: mariana.stanistic@ibiss.bg.ac.rs

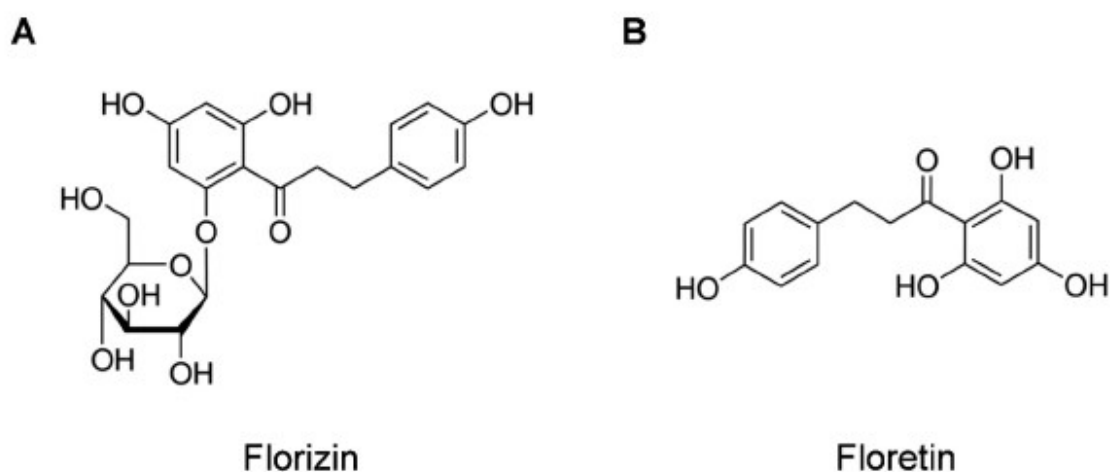
Abstract

Phloridzin and phloretin are dihydrochalcones highly specific to domestic apple (*Malus × domestica* Borkh.) and other species from genus *Malus*. Auto-allelopathic potential of these phenolics was recognized in 'Apple Replant Disease' (ARD) characterized by stunted growth, reduced root system and low yields in apple trees replanted on lands that previously supported apple orchards. Physiological basis of phloridzin and phloretin autotoxicity are ultrastructural and molecular alterations that include increased catalase, peroxidases and superoxide dismutase activities, raised malondialdehyde and proline contents, and high expression of genes involved in cell defence system. The latest research on model plant *Arabidopsis thaliana* indicates phytotoxicity of these dihydrochalcones towards other plant species. Phloretin inhibits *A. thaliana* seedlings growth and development inducing agravitropic phenotype and morphological and ultrastructural malformations in treated seedlings. Altered expression of *CDKA1;1*, *CDKB2;1*, *CYCA3;1* and *CYCB2;4* cell cycle genes and genes involved in auxin homeostasis (*PINs*, *AUX1*, *LAX3*, *ABCBs*, *TAA1* and *YUCs*) and gibberellin biosynthesis (*GA20ox2* and *GA3ox1*) are in the physiological bases of phloretin phytotoxicity. This mechanism makes phloretin a prospective candidate for an eco-friendly bioherbicide and paves the way for further research of phloretin role in ARD.

Key words: allelopathy, dihydrochalcones, apple (*Malus × domestica* Borkh.), phenolics, phloretin, phloridzin

Alelopatija je od davnina poznata kao pojava da jedna biljna vrsta suzbija i kontroliše rastenje i razviće biljaka u svom okruženju, što joj omogućava efikasnije korišćenje dostupnih resursa. Hemijska jedinjenja koja ispoljavaju alelopatske efekte nazivaju se alelohemikalijama. Većina ovih jedinjenja su sekundarni metaboliti koji nastaju kao nusprodukti primarnih metaboličkih puteva. Alelohemikalije mogu biti prisutne kako u vegetativnim, tako i u reproduktivnim biljnim organima, ali se njihove koncentracije mogu značajno razlikovati među organima pa čak i tkivima iste biljne vrste [1]. Ova jedinjenja najčešće dospevaju u zemljište eksudacijom korena, evaporacijom ili spiranjem sa listova i stabla, ili degradacijom biljnih ostataka u zemljištu aktivnošću mikroorganizama [2].

Uprkos svojoj sveprisutnosti i raznovrsnosti, alelohemikalije mogu biti svrstane u tri osnovne grupe: (1) terpenoide, (2) jedinjenja koja sadrže azot (N) i (3) fenolna jedinjenja [3]. Dihidrohalkoni (DHH) su posebna grupa fenolnih jedinjenja u čijoj se osnovi nalaze dva šestočlana ugljenikova (C6) prstena povezana mostom od tri ugljenikova atoma dok je dvostruka veza koja je karakteristična za prekursore flavonoida – halkone, kod DHH redukovana (Slika 1). Specifičan izvor DHH u prirodi su vrste roda *Malus*, uključujući i domestifikovanu jabuku (*Malus × domestica* Borkh.) kod koje DHH čine do 96-97% ukupnih fenolnih jedinjenja u listovima [4,5].



Slika 1. Struktura dihidrohalkona florizina (A) i floretina (B). Preuzeto iz Stanišić. 2019 [77]

Florizin (floretin 2'-O-glukozid) (Slika 1A) je prvo-otkriveni i najzastupljeniji DHH kod vrsta roda *Malus* koji čini 4-18% suve mase listova jabuke [6]. Zbog svoje visoke zastupljenosti, florizin se koristi kao osnovni parametar za klasifikaciju vrsta roda *Malus* [7] za determinaciju filogenetičkih i fitogeografskih odnosa u okviru subfamilije *Maloideae* [8], i u prehrambenoj industriji kao marker za utvrđivanje prisustva jabuke u voćnim sokovima [9]. Skorašnji napredak u razvoju analitičkih metoda omogućio je detektovanje ovog jedinjenja u tragovima i kod drugih vrsta porodice *Rosaceae* kao što su jagoda (*Fragaria ananassa* Duch.) [10] i divlja ruža (*Rosa canina*) [11], ali i vrsta iz drugih porodica kao što su *Fabaceae* i *Ericaceae* [12,13]. Ključni korak u sintezi florizina jeste proces glikozilacije aglikona floretina (3-(4-hidroksifenil)-1-(2,4,6-trihidroksifenil)-1-propanona) na poziciji 2' pomoću specifične uridin-difosfat-glikoziltransferaze (UDP-glukozo:floretin 2'-O-glucosiltransferaze) [14]. Osim u listovima, florizin se u znatnim količinama nalazi i u korenu, stablu i kori

jabuke iz koje je prvi put i izolovan davne 1835. godine [15]. Ubrzo nakon toga, započela su i prva istraživanja vezana za efekat florizina u organizmu sisara, a značajniji rezultati vezuju se za istraživanja nemačkog fiziologa Joseph von Mering-a koji je izazvao eksperimentalnu glikozuriju kod pasa ubrizgavanjem čistog florizina [16]. Nakon jednog veka istraživanja mehanizma delovanja florizina u organizmu sisara, Alvarado i Crane [17] ga definišu kao inhibitora glukoznog transporta, a Vick i Deidrich [18] utvrđuju da je afinitet renalnog glukoznog transportera prema florizinu i do 3000 puta veći nego prema molekulu glukoze. Danas je poznato da florizin specifično inhibira SGLT1 Na-glukozni kotransporter glodara i SGLT2 kotransporter u apikalnom domenu epitelnih ćelija renalnih tubula čoveka [19]. Zbog sposobnosti da snizi nivo glukoze u krvi nezavisno od insulina, florizin je našao primenu u terapiji dijabetesa tipa 2 [20,21]. Inhibicija usvajanja glukoze u crevima i reasorpcije u bubržnim tubulama omogućava smanjenje telesne mase pacijenata i čini ga veoma privlačnim prirodnim terapeutikom i u lečenju gojaznosti [22].

Pored florizina, kod vrsta roda *Malus* identifikovano je najmanje još deset drugih DHH koji se razlikuju po mestu vezivanja i specifičnosti šećerne grupe, a svi su derivati aglikona floretina [23]. Zahvaljujući tipičnoj DHH strukturi, floretin je veoma fleksibilan molekul koji može aktivno da stupa u reakciju sa drugim biomolekulima u ćeliji (Slika 1B). Za razliku od florizina, sadržaj floretina je dosta nizak [24] ili ga čak nije moguće detektovati u nekim tkivima jabuke [25,6,26] usled brze konverzije u rastvorljive, glikozilovane forme koje su stabilne, nereaktivne i pogodne za transportovanje [27]. Izražena reaktivnost floretina rezultuje brojnim farmakološkim svojstvima kao što su: antimikrobno, antikancerogeno, antioksidativno, estrogeno, anti-inflamatorno, krio-protektivno i neuroprotektivno [28,29], što ga čini pogodnim za njegovu primenu u farmaciji, medicini i kozmetici.

Fiziološka uloga dihidrohalkona jabuke

Uprkos izuzetno visokom sadržaju florizina u jabuci, pogotovo u listovima i korenu, kao i zapaženom biološkom delovanju, fiziološka uloga floretina u biljkama još uvek nije sa sigurnošću utvrđena. Istraživanja sprovedena tokom prošlog veka su ukazala na inhibiciju formiranja cvetnih pupoljaka jabuke pod dejstvom florizina [30,31], kao i suzbijanje izduživanja koleoptila ovsu [32]. U uslovima kulture *in vitro* je primećeno da florizin dovodi do povećanja broja aksilarnih pupoljaka kod jabuke [33], kao i do povećanja broja korenova kod divlje sorte za kalemljenje M9 [34]. Egzogeno dodavanje florizina dovodi i do stimulacije procesa somatske organogeneze kod uljane palme [35]. Smatra se da visoka koncentracija florizina, kao dominantnog fenolnog jedinjenja u semenu, pogotovo semenjači, onemogućava dotok kiseonika do embriona nakon imbibicije i time sprečava početak klijanja ukoliko seme nije prethodno prošlo period hladne stratifikacije (0-4 °C) [36]. Pri niskim temperaturama, više kiseonika može da se rastvori u vodeno/fenolnoj barijeri, a manji deo biva vezan od strane polifenola, što dovodi do njegovog olakšanog dopremanja do embriona i otpočinjanja klijanja [37]. Novija histohemijska istraživanja ukazuju da je lokalizacija florizina u ćelijama palisadnog tkiva listova povezana sa njegovom ulogom u zaštiti tkiva od štetnog UV zračenja [38] kao i sa antioksidativnim potencijalom [5].

Utišavanje halkon-sintaze (CHS), ključnog enzima u sintezi glavnih flavonoida i dihidrohalkona jabuke, dovelo je do gubitka gotovo svih pomenutih jedinjenja i indukovalo izražene fenotipske efekte kod mutanata jabuke, uključujući patuljast rast nastao kao rezultat intenziviranog akropetalnog transporta auksina [39]. Utišavanje gena za floretin specifičnu glikoziltransferazu UGT88F1 prouzrokovalo je smanjenje sadržaja floretina, florizina i drugih polifenolnih jedinjenja u transgenim biljkama jabuke. Ove promene izazvale su povećanje intenziteta akropetalnog transporta auksina iz izdanaka i uzrokovale izražen patuljasti fenotip koji je predstavljao fenokopiju prethodno okarakterisanih CHS-deficijentnih mutanata jabuke [40].

Postoje dosta nepouzdana i često kontradiktorni podaci o ulozi florizina u odbrani jabuke od bolesti i štetočina. Smatra se da je florizin uključen u odbranu biljaka jabuke od infekcije gljivom *Venturia inequalis* koja izaziva ekonomski značajnu bolest – čadjavu pegavost lista i krastavost plodova jabuke. Infekcija venturijom dovodi do kolapsa ćelije i oksidacije njenih metabolita, među kojima i florizina, aktivnošću enzima polifenol oksidaze. Oksidovani produkti florizina inaktiviraju pektinaze gljive i time onemogućavaju širenje patogena koje se zasniva na razgradnji srednje lamele ćelijskog zida biljne ćelije [41]. Sličan mehanizam je predložen i u slučaju infekcije gljivom *Phlyctaena vagabunda* u kome oksidacija florizina igra značajnu ulogu u ograničavanju širenja infekcije [42]. Međutim, Gaucher i saradnici [43] su testovima *in vitro* ustanovili relativno nisku antimikrobnu aktivnost florizina, ali značajno veću aktivnost njegovog aglikona floretina. Takođe, jasna povezanost nivoa florizina i otpornosti na plamenjaču izazvanu bakterijom *Erwinia amylovora* nije utvrđena na polju [44].

Pitanje uloge florizina u odbrani jabuke od štetnih insekata uvodi nove dileme. Tako npr. florizin odbija vaši *Myzus persicae* i *Amphorophora agathomica* [45], dok je atraktant za *Rhopalosiphum insertum* i zelenu vaš jabuke (*Aphis pomi*) [46]. Larve vrste *Spodoptera littoralis* izbegavaju ishranu već oštećenim listovima jabuke koji povećano sintetišu florizin već nekoliko dana nakon nastanka oštećenja [47]. Fulcher i sar. [48] su ukazali na značaj florizina u odbrani biljaka jabuke od japanske bube (*Papillia japonica*), s obzirom na to da je stepen oštećenja listova korelirao sa sadržajem florizina u listovima 10 različitih sorti.

Alelopatsko delovanje fenolnih jedinjenja jabuke

Potencijalnu autoalelopatsku aktivnost florizina i floretina sugerisao je Börner davne 1959. godine [50], smatrajući ih odgovornim za razvoj bolesti jabuke poznate kao „*Apple Replant Disease*“ (ARD). Ova bolest se manifestuje usporenim i zakržljanim rastom stabla i korena, kao i slabim plodonošenjem sadnica posađenim na zemljištu na kome su prethodno gajena stabla jabuke [51]. Ispitivanje korenovog sistema voćaka obolelih od ARD je ukazalo na pojavu propadanja epidermalnih ćelija i kortikalnog tkiva korena i značajnu redukciju u razvoju lateralnih korenova [52,53]. Takođe je primećen veoma mali broj funkcionalnih korenskih dlačica na obolelim korenovima [54]. Iako je problem uspostavljanja zasada jabuke na zemljištu prethodnih voćnjaka dokumentovan još pre dva stoleća, etiologija razvoja ARD je i danas ostala nepoznanica. Postoje mnogobrojne studije o učešću različitih zemljišnih organizama u razvoju ARD, kao što su parazitske nematode iz roda *Pratylenchus* [55], aktinomicete [56] i veliki broj gljiva [57,58]. Primena fungicida u predtretmanu zemljišta, kao i sterilizacija zemljišta koja je često dovodila do uspešnog suzbijanja razvoja simptoma bolesti, navela je na zaključak da su gljive najčešći uzročnici ove bolesti [59]. Sa druge strane, mnogobrojni kontradiktorni rezultati i činjenica da primena fungicida širokog spektra delovanja, iako menja sastav mikrobiotskih zajednica, ne utiče na bolji rast i povećanje prinosa jabuke [60] bacaju dodatnu senku na problem ARD-a.

Iako je Börner još 1959 i 1960 godine [50, 61] nagovestio ulogu florizina i floretina detektovanih u zemljištu voćnjaka jabuke u razvoju simptoma ARD, dugi niz godina njihovo autoalelopatsko delovanje nije proučavano. Dostupni literaturni podaci ukazuju da eksudati korena divljih vrsta jabuke, *Malus pumila* i *Malus prunifolia*, deluju inhibitorno na klijanje semena i razviće klijanaca sopstvene vrste [62,63]. Ovi rezultati nagoveštavaju da bi dihidrohalkoni koji dospevaju u zemljište izlučivanjem korena jabuke ili razgradnjom izumrljanih biljnih delova (opalog lišća, plodova, kore ili korena) [64], mogli biti ključni faktori u razvoju simptoma ARD. Nicola i saradnici [65] su primetili da je tretman klijanaca jabuke sorte Fuji mešavinom zemlje i usitnjenih korenova M26 sorte za kalemljenje, nakon četiri meseca doveo do značajnog smanjenja sadržaja hlorofila, mase korenova i ukupne mase tretiranih biljaka. UHPLC analiza sa masenom spektrometrijom ukazala je

na značajan porast sadržaja florizina i floretina u primenjenoj mešavini u odnosu na kontrolnu podlogu. Tretman florizinom u niskoj koncentraciji (1,0 μM) je delovao stimulatorno na rast klijanaca vrste *M. hupehensis*, dok su visoke koncentracije (1-4 mM) ispoljile inhibitorno delovanje [66] izazvavši ultrastrukturne promene na hloroplastima i mitohondrijama ćelija listova i/ili korena. Primena visokih koncentracija dovela je do povećanja sadržaja malondialdehida (MAD) - indikatora lipidne peroksidacije membrane, ali i aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze (SOD), peroksidaze (POD) i katalaze (CAT). Pri višim koncentracijama florizina uočeno je i sniženje stopa transpiracije i fotosinteze [66]. Sličan efekat florizina primećen je i kod klijanaca divlje vrste *M. micromalus* u čijim korenovima je zabeležen porast aktivnosti SOD, POD i CAT, kao i sadržaj MAD i prolina srazmerno primenjenoj koncentraciji i trajanju tretmana [67]. Wang i sar. [68] su ukazali na smanjenje stope respiracije i aktivnosti enzima uključenih u ciklus trikarboksilnih kiselina u korenovima *M. hupehensis* tretiranih 4,0 mM florizinom. Nedavno, Yin i sar. [69] su ukazali da floretin i florizin primenjeni u koncentracijama detektovanim u zemljištu voćnjaka takođe izazivaju povećanje nivoa ekspresije proteina uključenih u odbrambene mehanizme ćelija korena *M. hupehensis*.

Dihidroalkoni jabuke koji dospevaju u zemljište bilo eksudacijom korena ili razgradnjom biljnog materijala mogli bi delovati inhibitorno i na druge biljne vrste, uključujući i korove. Značajan ograničavajući faktor u proučavanju takvih alelopatskih interakcija u rizosferi predstavlja komplikovanost izolacije i identifikacije jedinjenja koje koren izlučuje, kao i kompleksnost ekosistema rizosfere i prisustvo mikroorganizama koji svojom aktivnošću mogu da modeluju delovanje alelohemikalija. U cilju otklanjanja činilaca koji utiču na promenu kvaliteta i kvantiteta izlučenih alelohemikalija, nedavno je uspostavljen model sistema *in vitro* kulture transformisanih korenova jabuke [26]. Uspostavljanje ovakvog model sistema zasnovano je na uvođenju pazušnih pupoljaka jabuke u kulturu *in vitro* i razvijanju pouzdanog i efikasnog sistema za regeneraciju izdanaka putem procesa *de novo* organogeneze [70] kao i optimizaciji faktora koji stimulišu regenerativni kapacitet eksplantata [70,71]. Postupak genetičke transformacije posredstvom *Agrobacterium rhizogenes* 15834 vektora indukovao je pojavu transformisanih korenova na izdancima sorti melrouz, zlatni delišes, čadel i gloster, a vremenski koordinisana smena tretmana sa i bez indol-3-buterne kiseline (IBA) omogućila je pionirski poduhvat uspostavljanja samostalne permanentne kulture korenova jabuke na podlozi bez regulatora rastenja [26]. Metodom tačne hromatografije pod ultra visokim pritiskom sa masenom spektrometrijom (UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS) potvrđeno je da genetička transformacija nije dovela do promena u sadržaju glavnih sekundarnih metabolita u tkivu korena jabuke, florizina, glikozilovanih i aglikozilovanih flavonoida i fenolnih kiselina u odnosu na netransformisan koren jabuke. Na taj način, uspostavljanjem *in vitro* kulture transformisanih korenova jabuke stvoreni su uslovi za proučavanje alelopatskog potencijala jabuke u odsustvu mikroorganizama i drugih remetećih faktora rizosfere [26].

Fitotoksični potencijal eksudata korenova jabuke prema drugim biljnim vrstama uspešno je ispitan na model biljci arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Rezultati su pokazali da eksudat korenova jabuke ne deluje inhibitorno na klijanje semena arabidopsisa, ali je njegov fitotoksični efekat na rastenje i razviće klijanaca veoma izražen i ogleda se u značajnoj inhibiciji rasta korena i izdanaka (35,1% i 62,1%, redom) [26]. Eksudat korenova jabuke najviše utiče na proces obrazovanja lateralnih primordija, smanjivši broj bočnih korenova za 74% desetog dana tretmana. Analiza sadržaja sekundarnih metabolita u eksudatu transformisanih korenova jabuke je ukazala na nizak, ali veoma uravnotežen sadržaj dihidroalkona florizina (8,01 ng mL⁻¹ tj. 0,017 μM) i floretina (7,49 ng mL⁻¹ tj. 0,027 μM), kao i kafeinske (14,58 ng mL⁻¹ tj. 0,08 μM) i hlorogene kiseline (8,82 ng mL⁻¹ tj. 0,025 μM) [26]. S obzirom na to da brojni literaturni podaci ukazuju na alelopatsko delovanje hlorogene i kafeinske kiseline, bilo samostalno, bilo u okviru biljnih izolata [72,73,74,75], fitotoksično delovanje floretina i florizina moralo je biti dodatno ispitan.

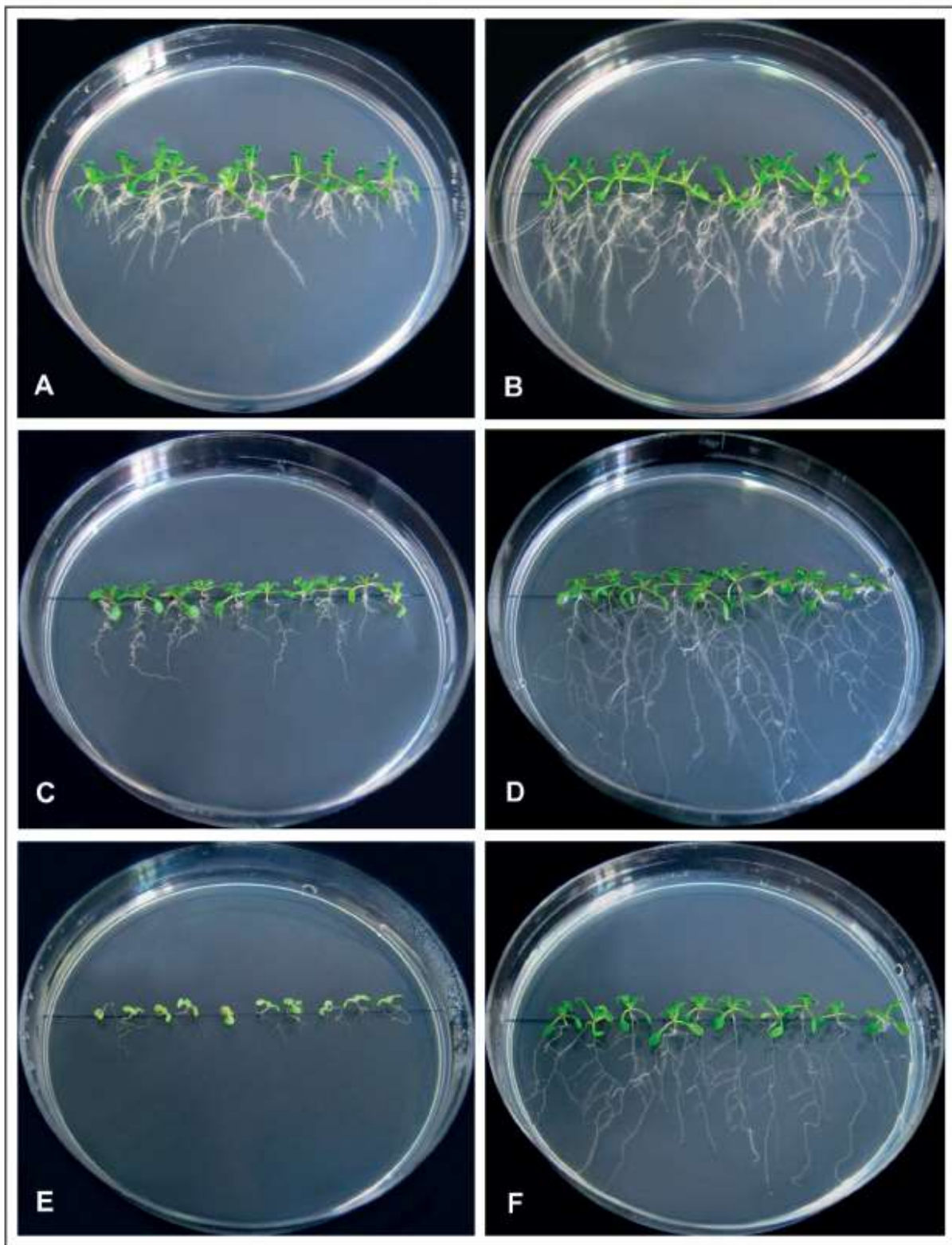
Alelopatski efekat biljnih izolata je najčešće posledica sinergističkog delovanja većeg broja jedinjenja prisutnih u relativno niskim koncentracijama [76]. Međutim, pojedinačna jedinjenja ostvaruju sličan alelopatski efekat kao i biljni izolati samo ukoliko su primenjeni u mnogostruko većim koncentracijama od onih u kojima su zastupljeni u biljnom izolatu [75]. Zbog toga je alelopatski potencijal florizina i floretina procenjen na osnovu efekata tretmana sa 125, 250 i 500 μM čistih supstanci, na klijanje i morfološke karakteristike tokom rastenja i razvića klijanaca arabidopsisa, iako su detektovane koncentracije ovih dihidrohalkona u tačnoj hranljivoj podlozi u kojoj su gajeni transformisani korenovi jabuke bile oko 100 puta niže [26].

Tretman florizinom ispoljio je dozno-zavisni efekat na klijance arabidopsisa ali je statistički značajno smanjenje dužine korena (21,3%) i broja lateralnih korenova (63,5%) zabeleženo tek na tretmanu sa 500 μM floretinom [77]. Inhibitorni uticaj ovog tretmana na posmatrane morfološke parametre je bio slabiji u poređenju sa efektom eksudata korenova jabuke, ali su oba tretmana imala izraženiji efekat na razviće lateralnih korenova, nego na izduživanje primarnog korena klijanaca. Alelopatski efekat eksudata korenova jabuke u odnosu na čist florizin bi se mogao pripisati sinergističkom dejstvu njegovih komponenti. Na tretmanu sa 500 μM florizinom zapažena je i veoma karakteristična promena u izgledu korena klijanaca, koji je rastao uvijajući se i formirajući oblik nalik sinusoidi, dok su lateralni korenovi bili veoma retki i male dužine [77].

Tretman floretinom je izazvao značajnu dozno-zavisnu inhibiciju rastenja i razvića klijanaca arabidopsisa koja je bila dosta izraženija nego u slučaju tretmana florizinom. Najosetljiviji na delovanje floretina je koren klijanaca koji je nakon 10 dana tretmana sa 500 μM floretinom bio znatno skraćen (74,2%) i sa manjim brojem lateralnih korenova (66,8%) u poređenju sa korenom kontrolnih netretiranih klijanaca (Slika 2) [77]. Floretin je ispoljio značajan efekat i na izdanke klijanaca koji su bili bledozelene boje, manje dužine (48,2%) i sa manjim brojem listova u poređenju sa kontrolnim. Takođe, 500 μM floretin je uslovio i pojavu specifičnog agravitropskog fenotipa klijanaca koji se odlikovao izvrnutim rastom kotiledona i hipokotila i nepravilnim oblikom korena u vidu petlje (Slika 2) [77]. Prisustvo slobodne hidroksilne grupe na C2 poziciji i odsusvo glikozilne grupe u molekulu floretina omogućava ovom dihidrohalkonu da reaguje intenzivnije sa drugim biološkim molekulima [78] što može objasniti njegovo pojačano fitotoksično delovanje u poređenju sa florizinom.

Ultrastrukturalna analiza ćelija mezofila klijanaca tretiranih floretinom je ukazala na promene u morfologiji ćelijskog zida, kao i strukturi i položaju hloroplasta u ćeliji [77]. Blaga izuvijanost ćelijskog zida primećena treći dan tretmana, rezultovala je formiranjem izraženih ulegnuća i ispupčenja na ćelijskom zidu desetog dana tretmana. Hloroplasti su zadobili okrugao oblik i izmešteni su i grupisani u unutrašnjosti ćelije, dok su tilakoidi grana i strome poprimili kružnu formu i izgubili pravilnu orijentaciju. Smanjenje rezervi skroba u hloroplastima nakon desetog dana izlaganja floretinu, kao i potpuno odsustvo amiloplasta i lipidnih kapi u citoplazmi potvrđuju da se narušena struktura hloroplasta usled stresa izazvanog floretinom značajno odražava na funkciju ćelija [77].

Indol-3-sirćetna kiselina (IAA), kao osnovni biološki aktivan oblik auksina, ima centralnu ulogu u razviću biljnog organizma i usklađivanju odgovora biljke na promenljive uslove životne sredine putem regulacije procesa ćelijske deobe, elongacije i diferencijacije. Ključni aspekt delovanja auksina je zasnovan na fino koordinisanim procesima biosinteze, konjugacije, degradacije i polarnog transporta auksina (eng. *Polar Auxin Transport (PAT)*,) koji omogućavaju uspostavljanje lokalnog maksimuma i morfo-genetskih gradijenata u okviru biljnog tkiva. Osnovni mehanizam koji kontroliše PAT obuhvata procese aktivnog ulaska (influksa) i izlaska (efluksa) iz ćelija preko nekoliko specifičnih grupa transportera označenih kao AUX1/LAX (eng. *AUXIN1/LIKE AUXIN1*) transporteri i PIN (eng. *PIN-FORMED*) i ABCB (MDR) proteini (eng. *MULTI-DRUG RESISTANCE/P-GLYCOPROTEIN (MDR/PGP)*, *ATP-BINDING CASSETTE (ABC)*) [79,80]. Kvantitativnom RT-PCR anali-



Slika 3. Klijanci *A. thaliana* nakon 10 dana tretmana na $\frac{1}{2}$ MS podlozi sa floretinom u rastućim koncentracijama od 125 μ M (A), 250 μ M (C) ili 500 μ M (E) u poređenju sa odgovarajućom kontrolom. Kontrolni tretman je sadržao istu količinu rastvarača DMSO koliko i odgovarajući tretman floretinom (0,035% (B), 0,07% (D) i 0,14% (F) (v/v) DMSO za tretmane sa 125 μ M, 250 μ M i 500 μ M floretinom, redom). Klijanci su se razvijali u Petri kutijama postavljenim uspravno. Preuzeto iz Stanišić, 2019 [77]

zom (qPCR) ekspresije gena uključenih u glavni put biosinteze auksina (IpyA put) i polarni transport auksina, utvrđene su promene u ekspresiji koje ukazuju na narušenu homeostazu auksina i verovatno stoje u osnovi agravitropskog fenotipa klijanaca [77]. Tretman 500 μ M floretinom je koordinisano delovao na sve ispitivane gene *PIN* familije (*PIN1*, *PIN2*, *PIN3* i *PIN7*), kao i *AUX1* i *LAX3* gene indukovavši gotovo identičan ekspresioni vremenski profil sa karakterističnim povećanjem ekspresije 6 h nakon početka tretmana i manjim smanjenjem nakon 12 h i 24 h u poređenju sa nivoom nakon 6 h [77]. Međutim, statistički značajna promena ekspresije zabeležena je isključivo kod *PIN1*, *PIN3* i *PIN7* gena, zaduženih za regulaciju akropetalnog transporta auksina i njegovo preusmeravanje i distribuciju u lateralnim zonama apeksa [81,82]. Floretin je značajno stimulisao i ekspresiju *ABCB1* gena, dok uticaj na ekspresiju *ABCB4* i *ABCB19* gena u korenovima klijanaca nije zabeležen [77].

Ekspresioni profili gena uključenih u biosintezu auksina su varirali ili čak bili suprostavljeni u korenovima i izdancima tretiranih klijanaca [77], verovatno kao rezultat poznate funkcionalne redundantnosti članova *TAA* and *YUC* familije gena. *TAA1* i *YUC* geni kodiraju enzime koji učestvuju u najznačajnijem putu sinteze IAA kod arabidopsisa, koji se odvija preko indol-3-piruvata (IPyA)[83]. *TAA1* gen kodira triptofan aminotransferazu (TAA), koja katalizuje reakciju deaminacije L-triptofana do IPyA [84,85], dok *YUC* geni kodiraju monooksigenaze koje sadrže flavin i katalizuju reakciju konverzije IPyA do IAA [86]. Statistički značajano sniženje *TAA1* ekspresije u korenovima je primećeno 12 h nakon aplikacije floretina, u istoj vremenskoj tački u kojoj je ekspresija *TAR2* gena povećana [77] što je verovatno posledica uloge koje *TAA1* i *TAR2* geni dele u regulaciji formiranja auksinskog maksimuma u meristemskom tkivu korena [84]. Slično, ekspresija *YUC3* gena u korenovima je bila suprostavljena ekspresiji *YUC4* gena, dok ekspresija *YUC6* i *YUC8* gena nije bila statistički značajno izmenjena u odnosu na kontrolu [77]. Proučavajući ekspresiju gena *YUC* genske familije kod krmovog stabla pri različitim stresogenim tretmanima, Yan i sar. [87] su primetili da je kao odgovor na nisku temperaturu, ekspresija *CsYUC10b* gena bila dramatično povišena, a ekspresija *CsYUC4* snižena. Slično, ekspresija *CsYUC10a* i *CsYUC11* je bila potpuno suprostavljena ekspresiji *CsYUC10b* gena u slučaju slanog stresa, sugerišući da različiti članovi *YUC* genske familije deluju antagonistički u istim stresnim uslovima kako bi održali odgovarajući nivo auksina u ćeliji i obezbedili održanje auksinske homeostaze. Činjenica da su enzimi koji katalizuju oba koraka u IpyA biosintetičkom putu kodirani multigenskim familijama daje jednostavan mehanizam za generisanje širokog opsega različitih ekspresionih odgovora u ćeliji.

Tretman floretinom doveo je i do promena u ekspresiji *GA20ox2* i *GA3ox1* gena koji kodiraju enzime GA20 i GA3 oksidazu odgovorne za završne korake u biosintezi bioaktivnih giberelina (GA) u citoplazmi [88]. U korenovima tretiranih klijanaca, promene ekspresije *GA3ox1* i *GA20ox2* gena u posmatranim vremenskim tačkama su imale gotovo identičan trend promene kao i one zabeležene u korenovima kod ispitivanih gena uključenih u polarni transport auksina [77]. Promena u nivou ekspresije *GA20ox2*, 6 h od početka tretmana je bila znatno izraženija nego u slučaju *GA3ox1* i ostalih pomenutih gena. Znatno povišena ekspresija *GA3ox1* i *GA20ox2* gena u korenovima tretiranih klijanaca ukazuje na moguće povećanje nivoa endogenih giberelina i njihovo inhibitorno delovanje na razvoj lateralnih korenova. Gou i saradnici [89] su potvrdili da porast sadržaja giberelina inhibira rane korake u formiranju lateralnih korenova topole (*Populus* sp.), dok giberelin-deficijentni i giberelin-neosetljivi mutanti razvijaju povećan broj lateralnih korenova u odnosu na kontrolu. Ovakvi mutanti imaju i sniženu ekspresiju *PIN3* gena što ukazuje na moguću interakciju giberelina i auksina u regulaciji formiranja lateralnih korenova [89].

U osnovi inhibicije rasta korenova klijanaca izazvane floretinom stoji i poremećaj ekspresije gena za kinaze zavisne od ciklina (CDK) koje imaju centralnu ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa i evolutivno očuvanom mehanizmu ćelijske deobe kod eukariotskih organizama [90,91]. CDK pripadaju familiji serinskih/treoninskih

protein-kinaza, čija je specifičnost prema supstratu određena vezivanjem za odgovarajući ciklin (CYC), a aktivnost regulisana od strane serije različitih CDK aktivatora i inhibitora [92]. Specifični kompleksi ciklina i kinaza zavisnih od ciklina kontrolišu prolazak ćelije kroz faze ćelijskog ciklusa na različitim kontrolnim tačkama. Istraživanja ukazuju da alelohemikalije mogu uticati na različite aspekte kontrole ćelijskog ciklusa kod biljaka [93,94,95,96]. Tretman klijanaca arabidopsisa floretinom je doveo do povećanja nivoa ekspresije gena za kinaze zavisne od ciklina *CDKA1;1* i *CDKB2;1* i cikline *CYCA3;1* i *CYCB2;4* koja se odlikovala karakterističnim vremenskim profilom sa maksimalnim povećanjem 6 h od početka tretmana, izuzev *CYCB2;4* gena kod koga je ekspresija bila povećana u svim vremenskim tačkama tretmana.

Zaključak

Narušena strukturna organizacija ćelije usled delovanja floretina, direktno se odražava na njeno funkcionisanje, i moguće da je povezana sa disbalansom u sintezi i transportu auksina i giberelina kao ključnih regulatora esencijalnih procesa u biljnom organizmu. Narušavanje bilo koje komponente složenog sistema interakcija, neizostavno rezultuje promenama koje se odražavaju na nivou morfologije kao najviše instance. Izraženo fitotoksično dejstvo floretina otvara vrata daljim istraživanjima u cilju saznanja molekularnih i fizioloških mehanizma njegovog dejstva. Buduća istraživanja mehanizma delovanja floretina bi mogla doprineti rasvetljavanju njegove uloge u razvoju simptoma ARD, ali i utrti put primeni floretina kao novog ekološko-bezbednog herbicida u skladu sa sve većim svetskim potrebama za proizvodnjom zdrave hrane i zaštitom potrošivih prirodnih resursa.

Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan pod pokroviteljstvom Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj ugovora: 451-03-68/2022-14/ 200007.

Literatura

1. Qasem JR, Foy CL. Weed allelopathy, its ecological impacts and future prospects: a review. *Journal of Crop Production* 2001;4:43-92.
2. Bertin C, Yang X, Weston LA. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 2003;256:67-83.
3. Hvattum E. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16(7):655-62.
4. Pontais I, Treutter D, Paulin JP, Brisset MN. *Erwinia amylovora* modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiologia Plantarum* 2008; 132:262-271.
5. Dugé de Bernonville TD, Gaucher M, Guyot S, Durel CE, Dat JF, Brisset MN. The constitutive phenolic composition of two *Malus domestica* genotypes is not responsible for their contrasted susceptibilities to fire blight. *Environmental and Experimental Botany* 2011;74:65-73.
6. Mikulic Petkovšek M, Stampar F, Veberic, R. Seasonal changes in phenolic compounds in the leaves of scab-resistant and susceptible apple cultivars. *Canadian journal of plant science* 2009; 89:745-753.
7. Williams AH. Dihydrochalcones; their occurrence and use as indicators in chemical plant taxonomy. *Nature* 1964;202(4934):824-5.
8. Aldasoro JJ, Aedo C, Navarro C. Phylogenetic and phytogeographical relationships in *Maloideae* (*Rosaceae*) based on morphological and anatomical characters. *Blumea-Biodiversity, Evol Biogeogr Plants* 2005;50(1):3-32.
9. Fernández de Simón B, Pérez-Illarbe J, Hernández T, Gómez-Cordovés C, Estrella I. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *J Agric Food Chem.* 1992;40(9):1531-5.
10. Hilt P, Schieber A, Yildirim C, Arnold G, Klaiber I, Conrad J, et al. Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 2003;51(10):2896-9.
11. Hvattum E. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16(7):655-62.
12. Turner A, Chen SN, Joike MK, Pendland SL, Pauli GF, Farnsworth NR. Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* by cranberry juice: a new antiadherence assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2005;53:8940-47.
13. Dong H, Ning Z, Yu L, Li L, Lin L, Huang J. Preparative separation and identification of the flavonoid phlorhizin from the crude extract of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. *Molecules* 2007;12:552-62.
14. Zhou K, Hu L, Li P, Gong X, Ma F. Genome-wide identification of glycosyltransferases converting phloretin to phloridzin in *Malus* species. *Plant Sci.* 2017;265:131-45.
15. De Koninck L. Ueber das phloridzin (phlorrhizin). *European Journal of Organic Chemistry* 1835;15:75-77.
16. von Mering J. Ueber kunstlichen Diabetes. *Centralbl Med Wiss* 1886; 531.
17. Alvarado F, Crane R. Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta* 162;56:170-72.
18. Vick H, Diedrich DF, Baumann K. Reevaluation of renal tubular glucose transport inhibition by phlorizin analogs. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1973;224:552-57.
19. Panayotova-Heiermann M, Loo DD, Wright EM. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:27099-105.
20. Gaisano H, Ostenson C, Sheu L, Wheeler M, Efendic S. Abnormal expression of pancreatic islet exocytotic soluble Nethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors in Got-Kakizaki rats is partially restored by phlorizin treatment and accentuated by high glucose treatment. *Endocrinology* 2002;143:4218-26.
21. McCrimmon R, Evans M, Jacob R, Fan X, Zhu Y, Shulman GI et al. AICAR and phlorizin reverse the hypoglycemia-specific defect in glucagon secretion in the diabetic BB rat. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2002;283: 1076-83.
22. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Sheltz M, et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *The New England Journal of Medicine* 2001;345: 1359-67.

23. Gosch C, Halbwirth H, Stich K. Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 2010;71:838-43.
24. Hunter LD, Hull LA. Variation in the concentrations of phloridzin and phloretin in apple foliage. *Phytochemistry* 1993;34:1251-54.
25. Hrazdina G. Response of scab-susceptible (McIntosh) and scab-resistant (Liberty) apple tissues to treatment with yeast extract and *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry* 2003;64:485-92.
26. Stanišić M, Ćosić T, Savić J, Krstić-Milošević D, Mišić D, Smigocki A, et al. Hairy root culture as a valuable tool for allelopathic studies in apple. *Tree Physiol* 2019; 39:888-905.
27. Jones P, Vogt T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 2001;213:164-74.
28. Nithiya T, Udayakumar R. *In vitro* antioxidant properties of phloretin-an important Phytocompound. *J. Biosci. Med.* 2016;4,85-94.
29. Behzad S, Sureda A, Barreca D, Nabavi SF, Rastrelli L, Nabavi SM. Health effects of phloretin: from chemistry to medicine. *Phytochem. Rev.* 2017;16:527-33.
30. Grochowska MJ. Studies on natural growth regulators in apple trees in relation to biennial bearing. *Bulletin De L'Academie Polonaise des Sciences* 1963;9:585-90.
31. Grochowska MJ. Identification of the growth inhibitor connected with flower bud formation in apple. *Bulletin De L'Academie Polonaise des Sciences* 1964;12:379-93.
32. Hancock CR, Barlow HWB, Lacey HJ. The behaviour of phloridzin in the coleoptile straight growth test. *Journal of Experimental Botany* 1962;12:401-08.
33. Jones OP. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature* 1976;262:392-93.
34. James DJ, Thurbon IJ. Rapid *in-vitro* rooting of the apple rootstock M9. *Journal of Horticultural Sciences* 1979;54:309-11.
35. Hanower J, Hanower P. Inhibition et stimulation, en culture *in vitro*, de l'embryogenèse des souches issues d'ex-plants foliaires de palmiers à huile. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences* 1984;298:45-8.
36. Bewley JD, Black M. *Seeds: Physiology of development and germination*. New York. Springer; 1994.
37. Come D, Tissaoui T. Interrelated effect of imbibition temperature and oxygen on seed germination. In: Heydecker W, editor. *Seed ecology*. Butterworths, London;1973.p.157-68.
38. Gaucher M, de Bernonville TD, Lohou D, Guyot S, Guillemette T, Brisset MN, et al. Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: Insight into the role of apple major flavonoids. *Phytochemistry* 2013;90:78-89.
39. Dare AP, Tomes S, Cooney JM, Greenwood DR, Hellens RP. The role of enoyl reductase genes in phloridzin biosynthesis in apple. *Plant physiology and biochemistry* 2013;72:54-61.
40. Dare AP, Yauk YK, Tomes S, McGhie TK, Rebstock RS, Cooney JM et al. Silencing a phloretin-specific glycosyltransferase perturbs both general phenylpropanoid biosynthesis and plant development. *Plant J.* 2017;91:237-50.
41. Raa J. Polyphenols and natural resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis* Netherlands Journal of Plant Pathology 1968;74:37-45.
42. Lattanzio V, Di Venere D, Linsalata V, Bertolini P, Ippolito A, Salerno, M. Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001;49:5817-21.
43. Gaucher M, de Bernonville TD, Lohou D, Guyot S, Guillemette T, Brisset MN et al. Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: Insight into the role of apple major flavonoids. *Phytochemistry* 2013;90:78-89.
44. Bell AC. Host plant resistance to fire blight (*Erwinia amylovora*) in the Rosaceae subfamily Maloideae. North Carolina State University; 2004.
45. Terra WR, Ferreira C, Jordao BP, Dillon RJ. Digestive enzymes. In: *Biology of the insect midgut*. Springer, Dordrecht;1996. p.153-94.
46. Klingauf F. Die wirkung des glucosids phlorizin auf das wirtswalverhalten von *Rhopalosiphum insertum* und *Aphis pomi* de geer (Homoptera: Aphididae) *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie* 1971;68:41-55.
47. Gutbrodt B, Mody K, Wittwer R, Dorn S. Within-plant distribution of induced resistance in apple seedlings: rapid acropetal and delayed basipetal responses. *Planta* 2011;133:1199-207.

48. Fulcher AF, Ranney TG, Burton JD, Walgenbach JF, Danehower DA. Role of foliar phenolics in host plant resistance of *Malus* taxa to adult Japanese beetles. *HortScience* 1998;33:862-65.
50. Börner H. The apple replant problem. I. The excretion of phlorizin from apple root residues. *Contributions Boyce from Thompson Institute* 1959;20:39-56.
51. Wittenmayer L, Szabó K. The role of root exudates in specific apple (*Malus x domestica* Borkh.) replant disease (SARD). *Journal Plant Nutrition Soil Science* 2000;163:399-404.
52. Savory BM. Studies on the occurrence and aetiology of specific replant diseases of perennial fruit crops. Ph.D. thesis. University of London, London; 1966.
53. Hoestra H. Replant diseases of apple in the Netherlands. Ph.D. thesis. Meded. Landbouwhogeschool Wageningen, the Netherlands; 1968.
54. Caruso FL, Neubauer BF, Begin MD. A histological study of apple roots affected by replant disease. *Canadian Journal of Botany* 1989;67:742-49.
55. Jaffee BA, Abawi GS, Mai WF. Role of soil microflora and *Pratylenchus penetrans* in an apple replant disease. *Phytopathology* 1982;72:247-51.
56. Wescott III SW, Beer SV, Israel HW. Interactions between actinomycete-like organisms and young apple roots grown in soil conducive to apple replant disease. *Phytopathology* 1987;77:1071-77.
57. Taylor JB, Wallace BD. Root canker in stone fruit caused by the fungus *Peniophora sacrata*. *Orchardist of New Zealand* 1970;434:263-65.
58. Braun PG. Effects of *Cylindrocarpum* and *Pythium* species on apple seedlings and potential role in apple replant disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 1995;17:336-41.
59. Mazzola M. Elucidation of the microbial complex having a causal role in the development of apple replant disease in Washington. *Phytopathology* 1998;88:930-38.
60. Yao S, Merwin IA, Abawi GS, Thies JE. Soil fumigation and compost amendment alter soil microbial community composition but do not improve tree growth or yield in an apple replant site. *Soil Biology and Biochemistry* 2006;38:587-99.
61. Börner, H. Liberation of organic substances from higher plants and their role in the soil sickness problem. *Bot. Rev.* 1960;26:393-424.
62. Zhang JH, Mao ZQ, Wang LQ, Shu HR (2007) Bioassay and identification of root exudates of three fruit tree species. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 257-261.
63. Bai R, Zhao X, Ma F, Li C. Identification and bioassay of allelopathic substances from the root exudates of *Malus prunifolia*. *Allelopathy Journal* 2009;23:477-84.
64. Yin C, Xiang L, Wang G, Wang Y, Shen X, Chen X et al. How to plant apple trees to reduce replant disease in apple orchard: a study on the phenolic acid of the replanted apple orchard *PloS one* 2016;11(12):e0167347.
65. Nicola L, Vrhovsek U, Soini E, Insam H, Pertot I. Phlorizin released by apple root debris is related to apple replant disease. *Phytopathologia Mediterranea* 2017;55:432-42.
66. Jianghong Z, Zhiquan M, Liqin W. Effect of phloridzin on physiological characteristics of *Malus hupehensis* Rehd. seedlings. *Scientia Agricultura Sinica* 2007;40:492-98.
67. Cui X, Wang Y, Zhen W. The effects of phlorizin stress on the protective enzyme and metabolic regulation substances in the root of *M. micromalus*. *Frontiers of Agriculture in China* 2010;4:323-27.
68. Wang QQ, Hu YL, Zhou H, Zhan X, Mao ZQ, Zhu SH. Effects of phloridzin on the tri-carboxylic acid cycle enzymes of roots of *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Agricultura Sinica* 2012;45:3108-114.
69. Yin C, Duan YN, Xiang L, Wang G, Zhang X, Shen X et al. Effects of phloridzin, phloretin and benzoic acid at the concentrations measured in soil on the root proteome of *Malus hupehensis* Rehd. seedlings. *Scientia Horticulturae* 2018;228:10-17.
70. Mitić N, Stanišić M, Milojević J, Tubić L, Ćosić T, Nikolić R et al (2012). Optimization of *in vitro* regeneration from leaf explants of apple cultivars Golden Delicious and Melrose. *HortScience* 2012;47(8):1117-22.
71. Stanišić M, Ninković S, Savić J, Ćosić T, Banjac, N. The effects of β -lactam antibiotics and hygromycin B on *de novo* shoot organogenesis in apple cv. Golden Delicious. *Archives of Biological Sciences* 2018;70(1):179-90.
72. Patterson DT. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of Soybean (*Glycine max*). *Weed Science* 1981;29:53-9.

73. Garg N, Garg OP. Effect of exogenous treatment with some phenolic compounds on nitrogen fixation, growth and yield in *Cicer arietinum* L. (chickpea). *Current Science* 1989;58:31-2.
74. Reigosa MJ, Pazos-Malvido E. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *Journal of Chemical Ecology* 2007;33:1456-66.
75. Batish DR, Singh HP, Kaur S, Kohli RK, Yadav SS. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Journal of Plant Physiology* 2008;165:297-305.
76. Einhellig FA, Galindo JCG, Molinillo JMG, Cutler HG. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: Macías FA, Galindo JCG, Molonillo JMG, Cutler HG, editors. *Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*. CRC Press; 2004. p.217-38.
77. Stanišić M. Alelopatski potencijal sekundarnih metabolita transformisanih korenova jabuke-efekat floretina i florazina u kulturi *in vitro*. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet; 2020.
78. Barreca D, Bellocco E, Laganà G, Ginestra G, Bisignano C. Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosylated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chem.* 2014;160:292-97.
79. Zažímalová E, Murph AS, Yang H, Hoyerová K, Hošek P. Auxin Transporters - Why So Many? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010;2;:1-15.
80. Geisler M, Aryal B, Di Donato M, Hao P. A critical view on ABC transporters and their interacting partners in auxin transport. *Plant Cell Physiol.*2017;58:1601-1604..
81. Frimi J, Justyna W, Eva B, Kurt M, Klaus P. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 2002;415:806-09.
82. Billou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Frimi J et al. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 2005;433: 39-44.
83. Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M et al. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108;:18512-18517.
84. Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Doležal K, et al. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 2008;133:177-191.
85. Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, et al. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108:18518-18523.
86. Brumos, J., Alonso, J. M., and Stepanova, A. N. (2014). Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiol. Plant.* 151, 3–12.
87. Yan S, Che G, Ding L, Chen Z, Liu X, Wang H et al. Different cucumber *CsYUC* genes regulate response to abiotic stresses and flower development. *Sci. Rep.* 2016; 6:1-12.
88. Reid JB, Symons GM, Ross JJ. Regulation of gibberellin and brassinosteroid biosynthesis by genetic, environmental and hormonal faktors. In: Davies PJ, editore. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands;2004. p. 179-203.
89. Gou J, Strauss SH, Tsai CJ, Fang K, Chen Y, Jiang X, Busov VB. Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *The Plant Cell* 2010;22:623-639.
90. De Veylder L, Beeckman T, Inze´ D. The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007;8:655-665.
91. Berckmans B, De Veylder L. Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* 2009;12:599-605.
92. Inzé D, De Veylder L. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2006;40:77-105.
93. Nishida N, Tamotsu S, Nagata N, Saito C, Sakai A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 2005;31:1187-1203.
94. Sanchez-Moreiras AM, De La Pena TC, Reigosa MJ. The natural compound benzoxazolin-2(3H)-one selectively retards cell cycle in lettuce root meristems. *Phytochemistry* 2008;69:2172-2179.
95. Soltys D, Rudzinska-Langwald A, Kurek W, Gniazdowska A, Sliwinska E, Bogatek R. Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. *Planta* 2011;234:609-621.

96. Dmitrović S, Simonović A, Mitić N, Savić J, Cingel A, Filipović B, Ninković S. Hairy root exudates of allelopathic weed *Chenopodium murale* L. induce oxidative stress and down-regulate core cell cycle genes in Arabidopsis and wheat seedlings. *Plant Growth Regulation* 2015;75: 365-382.