

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Јелена М. Божуновић

Улога секоиридоидних глукозида и бета-
глукозидазе у одбрамбеном одговору кичице
(*Centaurium erythraea* Rafn) на стрес
повређивањем

докторска дисертација

Београд, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena M. Božunović

The role of secoiridoid glucosides and beta-glucosidase in common centaury (*Centaurium erythraea* Rafn) defense response to wounding

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Комисија за одбрану докторске дисертације

Ментори:

др Сузана Живковић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Анета Сабовљевић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Чланови комисије:

др Маријана Скорић, научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Данијела Мишић, научни саветник
Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Милорад Вујичић, доцент
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Датум одбране:

Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у оквиру пројекта основних истраживања „Физиолошка, хемијска и молекуларна анализа диверзитета ретких и угрожених биљних врста у циљу *ex situ* заштите и продукције биолошки активних једињења“, Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ОИ173024), у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институту од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду.

Мојој менторки, др Сузани Живковић, са којом сам направила прве кораке у научноистраживачком раду и која ми је пружила подршку и помоћ у свим сегментима израде ове дисертације дугујем посебну захвалност. Др Анети Сабовљевић се захваљујем на помоћи и вредним саветима током докторских студија и израде овог рада. Неизмерно хвала др Маријани Скорић на свеукупном ангажовању, подршци и разумевању које ми је пружала током целог пута израде ове дисертације. Срдачно се захваљујем свом шефу, др Данијели Мишић, на указаном поверењу, идејама, помоћи и охрабрењу које ми је несебично давала. Хвала др Милораду Вујичићу на подршци и доброј сарадњи током докторских студија.

Искрено се захваљујем др Драгани Матекало на пренесеном знању и спремности да помогне при решавању сваког проблема пред којим сам се нашла у експерименталном раду и писању дисертације. Захвална сам др Јасмини Гламочлији, др Ани Ћирић и др Марини Соковић на реализацији експеримената из области антимикуробног дејства. Др Урошу Гашићу се захваљујем на помоћи и ангажовању током реализације хемијских анализа. Захваљујем се др Милану Драгићевићу на помоћи у вези са статистичком обрадом података. Др Милици Радибратовић се захваљујем на помоћи приликом 3D моделовања протеина.

Захвалност дугујем и својим колегама др Браниславу Шилеру, др Славици Дмитровић, др Јасмини Несторовић Живковић, др Тијани Бањанац, др Биљани Филиповић, др Јелени Савић, др Слађани Тодоровић, Набилу Галавенџију, Лазару Новаковићу, Тијани Николић, Милани Лукић и Луки Петровићу и осталим колегама Одељења за физиологију биљака на пријатној атмосфери, саветима и помоћи коју су ми пружили.

Др Милици Милутиновић и Неди Аничић, мојим саборцима, хвала на несебичној помоћи у превазилажењу свих препрека на које сам наишла.

Мојим драгим пријатељицама Наташи Бојовић, др Јовани Хрустић и др Јелени Цветковић које су ме храбриле, стрпљиво слушале и биле уз мене, велико хвала.

Ивани и Јовану хвала што су увек ту (и када су далеко) да поделимо и терет и срећу. Борку неизмерно хвала на љубави и стрпљењу које има за мене.

Мојим родитељима, Милици и Момчилу хвала на тихој подршци, разумевању и љубави коју ми пружају од најранијег детињства. Њима посвећујем овај рад.

Улога секоиридоидних глукозида и бета-глукозидазе у одбрамбеном одговору кичице (*Centaurium erythraea* Rafn) на стрес повређивањем

Сажетак

Centaurium erythraea Rafn (кичица) је богат извор фармаколошки значајних специјализованих метаболита, укључујући фенолне киселине, флавоноиде и, у највећој мери секоиридоиде. Секоиридоидни глукозиди су монотерпеноидни молекули чији се скелет заснива на циклопентан-С-пирану за који је, на позицији C1 везан молекул β -D глукозе. Ова једињења подлежу ензиматској хидролизи у реакцији са ензимом β -глукозидазом, при чему се ослобађају одговарајући агликони који се даље укључују у метаболичке процесе биљке. Биосинтеза и разградња секоиридоида код кичице су координисани процеси који обезбеђују конститутивно присуство ових горких материја у ткивима биљке, а чија је примарна улога одбрана од патогена и хербивора. Као одговор на стрес повређивањем у листовима кичице долази до интензивније акумулације секоиридоида, што је резултат како појачане експресије већине биосинтетских гена, тако и снижене експресије β -глукозидазе која катализује први корак њихове разградње. Координисана експресија биосинтетских гена укључених у метаболизам секоиридоида регулисана је на транскрипционом нивоу и налази се под утицајем сигналног пута јасмонске киселине. Идентификоване су две варијанте ензима β -глукозидаза (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*) код кичице које показују високу специфичност ка секоиридоидним глукозидима као супстрату. Хидролитичка функција ензима потврђена је њиховом хетерологом експресијом у организму домаћину (*Escherichia coli*), пречишћавањем рекомбинантних протеина и ензиматским тестовима изведеним у условима *in vitro*. Резултати докторске дисертације пружају основу за примену метаболичког инжењеринга у циљу комерцијалне и одрживе производње секоиридоида из обновљивих извора.

Кључне речи: *Centaurium erythraea*, секоиридоидни глукозиди, β -глукозидаза, механичка повреда, експресија гена, функционална карактеризација гена

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Физиологија биљака

The role of secoiridoid glucosides and beta-glucosidase in common centaury (*Centaurium erythraea* Rafn) defense response to wounding

Abstract

Centaurium erythraea Rafn (centaury) is a rich source of pharmaceutically active specialized metabolites including phenolic acids, flavonoids and especially secoiridoids. Secoiridoid glucosides are monoterpenoids based on a cyclopentan-*C*-pyran skeleton with the β -*D* glucose linked at *C*1 position. These compounds are subjected to hydrolysis catalyzed by enzymes β -glucosidases, and resulting aglycones could be subsequently directed towards different metabolic pathways in plants. Coordinated metabolic processes, such as biosynthesis and catabolism of secoiridoid glucosides, ensure constitutive presence of these bitter taste compounds in plant tissue, which play a decisive role in the defense against pathogens and herbivores. Pronounced accumulation of secoiridoids in centaury leaves observed during the response of plants to mechanical wounding was preceded by the strong induction of the majority of biosynthetic genes as well as by the down-regulation of β -glucosidase, which catalyses the first step of secoiridoid glucosides catabolism. The expression of secoiridoids biosynthetic genes during response to wounding appears to be coordinately up-regulated and controlled at the transcriptional level, through the jasmonate signalling pathway. Two centaury β -glucosidases (*CeBGLU1* and *CeBGLU2*), showing high substrate specificity for secoiridoid glucosides, were identified. Hydrolytic function of the two enzymes was confirmed by heterologous expression of candidate genes in the host organism (*Escherichia coli*), purification of recombinant proteins, and *in vitro* enzymatic assays. The results of the doctoral dissertation provide the basis for the further application of metabolic engineering for commercial and sustainable production of secoiridoids from renewable sources.

Keywords: *Centaurium erythraea*, secoiridoid glucosides, β -glucosidase, mechanical wounding, gene expression, functional characterization of genes

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Plant physiology

Листа скраћеница

2 X YT - подлога за гајење бактерија
3D модели - тродимензионални модели протеина
4CL - 4-кумароил коензим А лигаза
7DLGT - глукозилтрансфераза 7-деоксилоганетинске киселине
7DLH - хидроксилаза 7-деоксилоганинске киселине
8HGO - 8-хидроксигераниол оксидоредуктаза
AACT - тиолаза ацетоацетил коензима А
ABA - /енг. *abscisic acid*/ апсцисинска киселина
AcAc-CoA - ацетоацетил коензим А
Ac-Co-A - ацетил коензим А
ANOVA - анализа варијансе
ANR - антоцијанидин редуктаза
ANS - антоцијанидин синтаза
APS - амонијум персулфат
Asn – аспарагин
BGLU - бета-глукозидаза
bHLH - /енг. *basic helix-loop-helix*/ *bHLH* група транскрипционих фактора
bp - /енг. *base pair*/ базни пар
bZIP - /енг. *basic-leucine zipper*/ транскрипциони фактор *bZIP*
C3H - *p*-кумарат-3-хидроксилаза
C4H - цинамат-4-хидроксилаза
cDNA - /енг. *complementary DNA*/ комплементарна ДНК
CDP-ME - 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-*D*-еритритол
CDP киназа - /енг. *calcium- dependent protein kinase*/ калцијум-везујуће протеинске киназе
CDP-ME2P - 2-фосфо-4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-*D*-еритритола
CHI - халкон изомераза
CHS - халкон синтаза
CMK - 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-*D*-еритритол киназа
COII - /енг. *coronatine insensitive 1*/ транскрипциони фактор *COII*
DAD - ултраљубичасти детектор са више диода
DAMP - /енг. *damage associated molecular patterns*/ молекуларни механизми специфични за механичко оштећење биљног ткива
DEPC - /енг. *diethyl pyrocarbonate*/ диетилпирокарбонат
DFR - дихидрофлавонол редуктаза
DMAPP - диметилалил дифосфат
DMSO - диметил сулфоксид
DXP - дезоксиксилулозо фосфат
DXR - дезоксиксилулозо фосфат редуктоизомераза
DXS - дезоксиксилулозо фосфат синтаза
EDTA - етилен диамин тетрасирћетна киселина

ESI - електроспреј јонизација
F3H - флаванон 3-хидроксилаза
FLS - флавонол синтаза
FS - флавон синтаза
G10H - гераниол-10-хидроксилаза
G8O - гераниол 8-оксидаза
GAP - глицералдеhid-3-фосфат
GES - гераниол синтаза
GH - глукозидна хидролаза
GLR - /енг. *glutamate receptor like proteins*/ протеини слични глутамату
Glu - глутаминска киселина
Gly - глицин
GPP - геранил дифосфат
GPPS - геранил дифосфат синтаза
HAMP - /енг. *herbivory associated molecular patterns*/ молекуларни механизми специфични за напад хербивора
HDR - 4-хидрокси-3-метилбут-2-енилдифосфат редуктаза
HDS - 4-хидрокси-3-метилбут-2-енилдифосфат синтаза
His - хистидин
HMBPP - 4-хидрокси-3-метилбут-2-енилдифосфат
HMG-CoA - хидрокси-метилглутарил коензим А
HMGR - редуктаза хидрокси-метилглутарил коензим А
HMGS - синтаза хидрокси-метилглутарил коензим А
HTC - хидроксицинамоил трансфераза
IFS - изофлаван синтаза
Ile - изолеуцин
IO - иридоид оксидаза
IPP - изопентенил дифосфат
IPTG - изо-пропил- β -D-тиогалактозид
IS - иридоид синтаза
JA - /енг. *jasmonic acid*/ јасмонска киселина
JA-Ile - коњугат јасмонске киселине и изолеуцина
JAM - /енг. *jasmonate-associated MYC2- like*/ транскрипциони фактор *JAM*
JAZ - /енг. *jasmonate zim-domain*/ транскрипциони фактор *JAZ*
LAMT - метилтрансфераза логанинске киселине
LAR - леукоантоцијанидин редуктаза
LB - *Luria Bertani* подлога за гајење бактерија
LEA протеини - /енг. *late embryogenesis abundant*/ протеини који се накупљају у фази касне ембриогенезе
MA - /енг. *Malt agar*/ подлога за гајење бактерија *MA*
MAP киназа - /енг. *mitogen-activated protein kinases*/ протеинске киназе активирани митогеном
MBC - /енг. *minimal bactericidal concentration*/ минимална бактерицидна концентрација
MCT - 2-C-метил-D-еритритол 4-фосфат цитидилил трансфераза

MEcPP - 2-С-метил-*D*-еритритол 2,4-циклодифосфат
MeJA - метил јасмонат
MEP - метилеритритол-фосфатни пут синтезе терпена
MFC - /енг. *minimal fungicidal concentrations*/ минимална фунгицидна концентрација
MHA - *Mueller Hinton agar* подлога за гајење бактерија
MIA - /енг. *monoterpenoid indole alkaloids*/ монотерпеноидни индолни алкалоиди
MIC - /енг. *minimal inhibitory concentration*/ минимална инхибиторна концентрација
MPDC - дифосфомевалонат киназа
MS медијум - /енг. *Murashige and Skoog*/ медијум за гајење биљака у култури *in vitro*
MVA - мевалонатни пут синтезе терпена
MYB - /енг. *myeloblastosis*/ транскрипциони фактор *MYB*
MYC2 - /енг. *myelocytomatosis oncogene 2*/ транскрипциони фактор *MYC2*
NADP - никотинамид аденин динуклеотид фосфат
NADPH - редуковани облик никотинамид аденин динуклеотид фосфата
NCBI - /енг. *national center for biotechnology information*/ национални центар биотехнолошких података
NFDM - /енг. *non fat dry milk*/ безмасно млеко
OD - /енг. *optical density*/ оптичка густина
Orbitrap - хибридни масени спектрометар високе резолуције
ORCA - /енг. *octadecanoid derivative responsive catharanthus apetala domain*/ транскрипциони фактор *ORCA*
PAL - фенилаланин амонијум лиаза
PCR - /енг. *polymerase chain reaction*/ ланчана реакција полимеразе
PDB - /енг. *potato dextrose brot*/ кромпир декстрозна подлога за гајење микрогљива
PEP - фосфоенолпируват
Phe - фенилаланин
PMK - фосфомевалонат киназа
pNPG - 4-нитрофенил- β -*D*-глукопиранозид
PVDF - поливинилиден флуорид
qPCR - /енг. *quantitative polymerase chain reaction*/ квантитативна ланчана реакција полимеразе
RNase A - рибонуклеаза А
SCF - /енг. *skip-cullin-F-box*/ мулти протеински комплекс Е3 убиквитин лигаза
SDS - /енг. *sodium dodecyl sulfate*/ натријум додецил сулфат
SDS-PAGE - /енг. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*/ електрофореза на денатуришућем полиакриламидном гелу
Ser - серин
SLS - секологанин синтаза
TEMED -тетраметилетилендиамин
Thr - треонин
Tris - 2-амино-2-хидроксиметил-пропан-1,3-диол
Trp - триптофан
TSB - *Triptic Soy Broth* подлога за гајење бактерија

UHPLC - /енг. *ultra high performance liquid chromatography*/ течна хроматографија под ултра високим притиском

UV - ултраљубичасти део спектра светлости

Val - валин

АП - апигетрин

АТП - аденозин трифосфат

ВТ - витексин

ГЛ - генциопикрал

ГПЦ - генциопикрин

ДК - епидеоксилоганинска киселина

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

ЕР - еритроцентаурин

ИК - изокверцитрин

ЛОГ - логанин

МЕ - метанолни екстракт кичице

МК - мевалонат киназа

ПЛ - повређени листови

РНК - рибонуклеинска киселина

СВ - сверозид

СВМ - сверцијамарин

СЛОГ - секологанин

ХГП - хидролизоване генциопикрин

ХМЕ - хидролизоване метанолни екстракт кичице

ХСВ - хидролизоване сверозид

ХСВМ - хидролизоване сверцијамарин

ЦЛ - цели листови

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Специјализовани метаболити биљака	1
1.1.1. Терпени – биосинтеза и класификација	4
1.1.1.1. Секоиридоиди.....	7
1.1.1.2. Биосинтеза секоиридоида	8
1.1.2. Фенолна једињења – класификација и биосинтеза	10
1.2. Биолошка активност специјализованих метаболита.....	11
1.2.1. Антиоксидативна активност	11
1.2.2. Антимикробна активност.....	12
1.3. Улога специјализованих метаболита у одбрамбеном одговору биљака на абиотички стрес.....	14
1.3.1. Повреда као врста абиотичког стреса.....	14
1.3.1.1. Сигнални пут јасмонске киселине.....	16
1.3.1.2. Улога глукозилованих специјализованих метаболита у одбрамбеном одговору биљака на стрес повређивањем	17
1.4. β -глукозидазе (EC 3.2.1.21) као битне компоненте одбрамбеног одговора биљака на абиотички стрес.....	19
1.4.1. β -глукозидазе представника реда <i>Gentianales</i>	20
1.4.2. β -глукозидазе у реакцији са секоиридоидима.....	20
1.5. <i>Centaurium erythraea</i> Rafn - карактеристике и лековита својства	21
2. ЦИЉЕВИ РАДА.....	25
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	26
3.1. Фитохемијске анализе екстраката листова кичице и секоиридоидних глукозида	26
3.1.1. Успостављање <i>in vitro</i> културе врсте <i>Centaurium erythraea</i> Rafn	26
3.1.2. Припрема узорака	26
3.1.2.1. Припрема метанолних екстраката листова кичице	26
3.1.2.2. Хидролиза екстраката кичице и секоиридоидних глукозида	26
3.1.2.2.1. <i>In vitro</i> ензиматска реакција хидролизе метанолних екстраката кичице	26
3.1.2.2.2. <i>In vitro</i> ензиматска реакција хидролизе секоиридоидних глукозида	27
3.1.2.2.3. <i>In vivo</i> биотрансформација метанолног екстракта кичице.....	27
3.1.3. <i>UHPLC/Orbitrap-MS/MS</i> квалитативна анализа.....	28
3.1.4. <i>UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS</i> квантитативна анализа секоиридоида	29
3.1.5. Одређивање антиоксидативне активности.....	29

3.1.5.1. Способност неутрализације <i>DPPH</i> радикала	30
3.1.5.2. Способност неутрализације <i>ABTS</i> радикала.....	30
3.1.5.3. Редуктивна активност (<i>FRAP</i> метода)	30
3.1.6. Испитивање антимикробне активности	31
3.1.6.1. Врсте микроорганизама.....	31
3.1.6.2. Микродилуциона метода.....	31
3.2. Механичко повређивање биљака и третман метил јасмонатом	32
3.2.1. Селекција и умножавање одабраног генотипа.....	32
3.2.3. Механичко повређивање биљака	33
3.2.4. Третман биљака метил јасмонатом.....	33
3.2.5. <i>UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS</i> квантитативна анализа секоиридоида.....	33
3.2.6. Анализа експресије гена	33
3.2.6.1. Изолација РНК из листова кичице	33
3.2.6.2. Електрофореза на агарозном гелу	34
3.2.6.3. Третман дезоксирибонуклеазом	34
3.2.6.4. Реверзна транскрипција.....	35
3.2.6.5. Квантитативни <i>PCR</i>	35
3.3. Изолација и клонирање гена кандидата за ензим β -глукозидазу кичице	38
3.3.1. Изолација и амплификација пуне дужине гена кандидата за β -глукозидазу кичице	38
3.3.2. Пречишћавање из агарозног гела.....	38
3.3.3. Клонирање	38
3.3.3.1. Спајање вектора и фрагмената ДНК	38
3.3.3.2. <i>TA</i> клонирање	39
3.3.3.3. Клонирање засновано на рестрикционим ензимима	39
3.3.4. Трансформација бактерија <i>Escherichia coli</i>	40
3.3.4.1. Бактеријски сојеви	40
3.3.4.2. Припрема компетентних ћелија	41
3.3.4.3. Трансформација бактерија топлотним шоком	41
3.3.4.4. Колонијски <i>PCR</i>	41
3.3.5. Изолација плаزمиде из бактеријских колонија.....	42
3.3.5.1. Изолација плазмиде помоћу комерцијалног комплета <i>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</i>	42
3.3.5.2. Изолација плазмиде техником алкалне лизе	43

3.3.5.3. Провера успешности изолације плаزمида <i>pRSETA</i> који носи ген од интереса..	43
3.3.6. Индукција експресије и изолација рекомбинантног протеина	43
3.3.6.1. Индукција експресије рекомбинантног протеина у бактеријама	43
3.3.6.2. Изолација рекомбинантних протеина из <i>Escherichia coli</i>	44
3.3.6.3. Електрофоретско раздвајање протеина.....	44
3.3.6.4. Имунодетекција протеина (енг. <i>Immuno blot analysis</i>)	45
3.3.7. Анализа активности рекомбинантног протеина	46
3.4. Филогенетске анализе	46
3.5. Хранљиве подлоге	47
3.6. Статистичка обрада података.....	48
4. РЕЗУЛТАТИ.....	49
4.1. Оптимизација аналитичких метода за идентификацију и квантификацију секоиридоидних глукозида и њихових агликона	49
4.1.1. <i>UHPLC/Orbitrap-MS</i> хемијска карактеризација метанолних екстраката <i>C. erythraea</i>	49
4.1.2. <i>UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS</i> профилисање секоиридоидних глукозида и њихових агликона.....	57
4.1.3. Промена биолошке активности екстракта кичице као последица њихове хидролизе	61
4.1.3.1. Антиоксидативна активност екстраката <i>C. erythraea</i> и секоиридоидних глукозида.....	61
4.1.3.2. Антимикробна активност екстраката <i>C. erythraea</i> и секоиридоидних глукозида	62
4.1.3.3. <i>In vivo</i> биотрансформација метанолних екстраката <i>C. erythraea</i> посредством гљиве <i>P. funiculosum</i>	64
4.2. Метаболизам секоиридоидних глукозида у листовима <i>C. erythraea</i> током одговора на стрес механичким повређивањем	65
4.2.1. Селекција високопродуктивног генотипа <i>C. erythraea</i> и његова клонална пропaгација.....	66
4.2.2. Профилисање иридоида и секоиридоида у листовима кичице након механички изазваног повређивања.....	66
4.2.3. Анализа експресије биосинтетских гена и гена за транскрипционе факторе укључених у метаболизам секоиридоида код <i>C. erythraea</i>	69
4.2.4. Улога сигналног пута јасмонске киселине у регулацији биосинтезе секоиридоида кичице	74

4.2.5. Улога β -глукозидаза у одбрамбеном одговору кичице на стрес изазван повређивањем листова	75
4.3. Изолација и карактеризација ензима β -глукозидазе из врсте <i>C. erythraea</i>	76
4.3.1. Изолација и клонирање гена кандидата за ензим β -глукозидазу из кичице	76
4.3.2. Индукција хетерологе експресије и пречишћавање рекомбинантних протеина <i>CeBGLU1</i> и <i>CeBGLU2</i>	80
4.3.3. Потврда функције рекомбинантних β -глукозидаза у ензиматским <i>in vitro</i> тестовима	81
4.3.4. Конструкција 3D модела ензима <i>CeBGLU1</i> и <i>CeBGLU2</i>	85
5. ДИСКУСИЈА	87
5.1. Предности извођења експеримената у контролисаним <i>in vitro</i> условима	88
5.2. Аналитичке методе за идентификацију и квантификацију секоиридоидних глукозида и њихових агликона	89
5.3. Биолошка активност екстракта <i>C. erythraea</i> и секоиридоидних глукозида као резултат активности β -глукозидазе	91
5.4. Промене у метаболизму секоиридоидних глукозида у листовима <i>C. erythraea</i> изазване механичким повређивањем ткива	94
5.5. Карактеризација ензима β -глукозидазе код врсте <i>C. erythraea</i>	101
6. ЗАКЉУЧЦИ	105
7. ЛИТЕРАТУРА	106
8. ПРИЛОГ	129
Биографија аутора	133

1. УВОД

1.1. Специјализовани метаболити биљака

Метаболизам сваког живог организма укључује реакције у којима се органска једињења синтетишу, разграђују и трансформишу у различите облике у циљу одржавања основних животних функција. Примарни метаболизам обухвата процесе у којима се синтетишу хемијска једињења неопходна за растење и развиће, одржавање ћелијске функције и репродукцију биљке, као што су шећери, липиди, аминокиселине и нуклеинске киселине. Једињења која нису неопходна за основне процесе у биљци, али су од есенцијалног значаја у интеракцијама биљних организама са околном средином, настају као продукти специфичних метаболичких процеса и заједничким именом се називају специјализовани метаболити (познати још и као секундарни метаболити).

Специјализовани метаболити су, за разлику од примарних метаболита, једињења ограничене дистрибуције у биљном царству, карактеристични за одређене породице биљака, некада родове, па чак и биљне врсте (*Talapatra* и *Talapatra*, 2015). Ова једињења имају различите функције у биљкама, као што су заштита од патогена, инсеката и хербивора и прилагођавање условима спољашње средине (абиотичким и биотичким агенсима) (Слика 1). Способност биљака да синтетишу специјализоване метаболите са својеврсном функцијом је еволутивно фаворизован процес (*Pichersky* и *Gang*, 2000).



Слика 1. Схематски приказ улоге специјализованих метаболита биљака у привлачењу опрашивача, интеракцији између биљака и одговору на абиотичке (недостатак воде, прекомерна инсолација, високе температуре) и биотичке (напад патогена и хербивора) факторе на природном станишту.

Ова једињења могу обезбедити опстанак врста у променљивим условима спољашње средине, повећати њихову компетитивност и успешност током дејства различитих механизма природне селекције. Могућност синтезе испарљивих једињења и пигмената код биљака је еволуирала у смеру привлачења опрашивача (*Dudareva* и *Pichersky*, 2000), а токсичних једињења тако да одбијају патогене и хербиворе или спречавају раст других биљних врста у окружењу (*Bennett* и *Wallsgrrove*, 1994). Све ово указује на еколошки значај специјализованих метаболита и њихову улогу у преживљавању биљака на њиховим природним стаништима.

Специјализовани метаболити се називају још и природни производи или фитохемикалије због својих фармаколошких и нутритивних одлика. Иако је до данас описано око 200000 специјализованих метаболита биљног порекла, претпоставља се да је овај број у природи знатно већи (*Afendi* и сар., 2012). Стога је у потрази за новим лековима, антибиотицима, инсектицидима и хербицидима велики број биљних врста постао предмет детаљних истраживања.

Примарни и специјализовани метаболити се не могу јасно међусобно раздвојити на основу хемијске структуре једињења или биосинтетског порекла (*Croteau* и сар., 2000) јер управо биосинтеза специјализованих метаболита почиње од прекурсора који су продукти примарног метаболизма: протеина (амино киселине), угљених хидрата (прости шећери) и липида (масне киселине). Ароматичне аминокиселине су главни прекурсори синтезе ароматичних једињења као што су феноли, флавоноиди и неки алкалоиди. Ацетил коензим А (*Ac-CoA*), који настаје гликолизом или β оксидацијом масних киселина, је прекурсор синтезе органских киселина, као и читаве групе специјализованих метаболита - терпена. Биосинтеза специјализованих метаболита почиње стимулусом који активира сигналне рецепторе, а затим се мрежом сигналних путева стимулус преноси и активира биосинтетске гене и транскрипционе факторе укључене у регулацију секундарног метаболизма. Када је основни скелет неког специјализованог метаболита доступан активирају се ензими који катализују хемијске реакције оксидације, редукције, метилације, изомеризације и др. у којима настају специфични продукти специјализованог метаболизма. Иако биосинтетски путеви специјализованих метаболита многих биљних врста нису расветљени, јасно је да постоји велики број ензима који су укључени у метаболичке процесе ових једињења. Поједини ензими могу катализовати реакције у којима из више различитих супстрата може настати већи број различитих једињења (*Allina* и сар., 1998; *Mauru* и сар., 1999). У неким случајевима један ензим може катализовати реакције синтезе више различитих продуката из истог супстрата (*Phillips* и сар., 1999). Ипак, у великом броју случајева ензими укључени у метаболичке путеве специјализованих метаболита су супстрат-специфични и катализују реакције синтезе једног продукта (*Pichersky* и *Gang*, 2000).

Специјализовани метаболити могу бити различите хемијске природе: терпени, феноли и секундарни метаболити који садрже азот (алкалоиди, цијаногени глукозиди и глукозинолати). Наведени метаболити су у биљкама стално (конститутивно) присутни, али у одређеним условима, као одговор на варирање у спољашњој средини (промена абиотичких и биотичких фактора) или неких ендогених фактора, може доћи до индукције њихове биосинтезе и акумулације. Терпени су најбројнија група секундарних метаболита која у биљкама има различите функције. Они могу бити регулатори растења, атрактанти опрашивача, компоненте одбрамбених механизма против патогена и хербивора (*Cheng* и сар., 2007), итд. Феноли се акумулирају у различитим стресним условима као што су *UV* радијација, ниска температура или претерана инсолација (*Bartwal* и сар., 2013). Алкалоиди и полиамини су моћни инхибитори реактивних врста кисеоника и анимални токсини који одбијају предаторе и патогене (*Matsuura* и сар., 2014; *De Bernonville* и сар., 2017). Цијаногени

глюкозиди такође служе у одбрани од хербивора јер се приликом повреде ткива нападом биљоједа ослобађа токсични молекул хидроген цијанид (*Poulton, 1990*). Специјализовани метаболити у истој биљци често могу имати вишеструке улоге. Тако, на пример, антоцијани истовремено могу бити атрактанти опрашивача, али и антимикуробни агенси. Једињења са азотом су резервне компоненте које чувају азот у везаном, нетоксичном облику, а у исто време учествују у заштити биљке од *UV* радијације (*Wink, 2015*). Специјализовани метаболити се у биљци акумулирају у високим концентрацијама у органима који су неопходни за преживљавање и репродукцију и процена је да њихова заступљеност у биљци износи од 1 до 3 % суве масе (*Wink, 1999*). Присуство неких класа једињења карактеристично је за одређене биљне редове и породице, па тако беталаине синтетишу биљке реда *Caryophyllales*, глюкоинолате биљке реда *Brassicales*, а полиацетилене представници фамилија *Asteraceae* и *Apiaceae*.

Велики број специјализованих метаболита има и биоактивна својства, па се користи у фармацији за припрему различитих производа на биљној бази. Људи су кроз своју историју користили продукте биљака у различите сврхе: као стимулансе (кофеин, никотин), инсектициде (пиперин, пиретрин), отрове (стрихнин, конин) и лекове (кодеин, атропин). Неке биљне врсте, осим што акумулирају специфичне компоненте у својим ткивима и органима, такође продукују и испарљиве специјализоване метаболите који се користе за справљање мирисних производа (екстракти руже, етарско уље лаванде и друга етарска уља).

Међутим, често су због ограниченог ареала распрострањења и специфичних услова у којима неке биљне врсте расту сужене могућности искоришћавања природних ресурса, док с друге стране није увек могућа култивација биљних врста од интереса. Поред тога, због хемијске природе метаболита које биљке производе није увек економски исплативо синтетисање ових једињења у лабораторијским условима. Ћелијска култура биљака представља једну од техника које се развијају са циљем повећања продукције метаболита који се тешко добијају хемијском синтезом или изолацијом из биљака (*Zhao и сар., 2005*). Биљке гајене у култури *in vitro* имају потенцијал да синтетишу исте природне производе које синтетишу биљке на природном станишту. Предности продукције ових метаболита у култури ћелија и ткива *in vitro* су: лакша изолација активних компонената, масовна производња без обзира на годишње доба, као и могућност оптимизације и прилагођавања услова гајења и примене елицитора синтезе (*Karuppusamy, 2009*). Развој биотехнологије у циљу стимулације синтезе биоактивних једињења у самим биљкама представља алтернативни пут за добијање велике количине природних производа од интереса из обновљивих извора.

У периоду од 1999. године до данас Светска Здравствена Организација објавила је 116 монографија које се баве медицински значајним биљкама, што говори о великом значају биљних природних производа (*Alamgir, 2017*) и потреби за гајењем биљних врста које продукују специјализоване метаболите. Како је основна улога специјализованих метаболита у биљкама заштита од различитих биотичких и абиотичких стресних фактора може се закључити да у условима стреса биљка реагује појачаном синтезом ових одбрамбених компоненти. Овакав приступ се може употребити и у циљу повећања синтезе специјализованих метаболита. Имајући све ово у виду главни аспекти у истраживањима која се баве продукцијом специјализованих метаболита на већој скали се могу груписати у:

- развијање *in vitro* културе биљних ћелија и повећање производње компоненти од интереса *in planta* деловањем различитих стимулуса (*Darrow и Bowers, 1999; Cisneros-Zevallos, 2003; Jablonická и сар., 2018*)

- испитивање сигналних путева укључених у одговор биљке на различите стимулусе (Cao и сар., 2016)
- модификације специјализованог метаболизма посредством транскрипционе регулације, што подразумева идентификацију транскрипционих фактора укључених у пут синтезе биоактивних компоненти (Memelink и Gantet, 2007; Colinas и Goossens, 2018)
- изолација и клонирање гена укључених у биосинтетски пут специјализованих метаболита (Verpoorte и сар., 2002; Miettinen и сар., 2014), реконструкција биосинтетских путева у хетерологим системима
- профилисање метаболичких интермедијера у синтези одређеног једињења у циљу разумевања комплетног пута синтезе специјализованих метаболита (Ilc и сар., 2016) и праћење квалитативних и квантитативних разлика током онтогенетског развића и у различитим условима спољашње средине
- анализа експресије гена укључених у синтезу једињења од интереса током онтогенетског развића и у зависности од променљивих услова спољашње средине ради разумевања регулације специјализованог метаболизма у ширем смислу (Dutta и сар., 2007)
- примена савремених техника секвенцирања нове генерације (NGS- енг. *New Generation Sequencing*) и модификације генома (енг. *Genome Editing*) и такозваног „omics“ приступа у метаболичком инжењерингу биосинтетских путева биоактивних једињења.

1.1.1. Терпени – биосинтеза и класификација

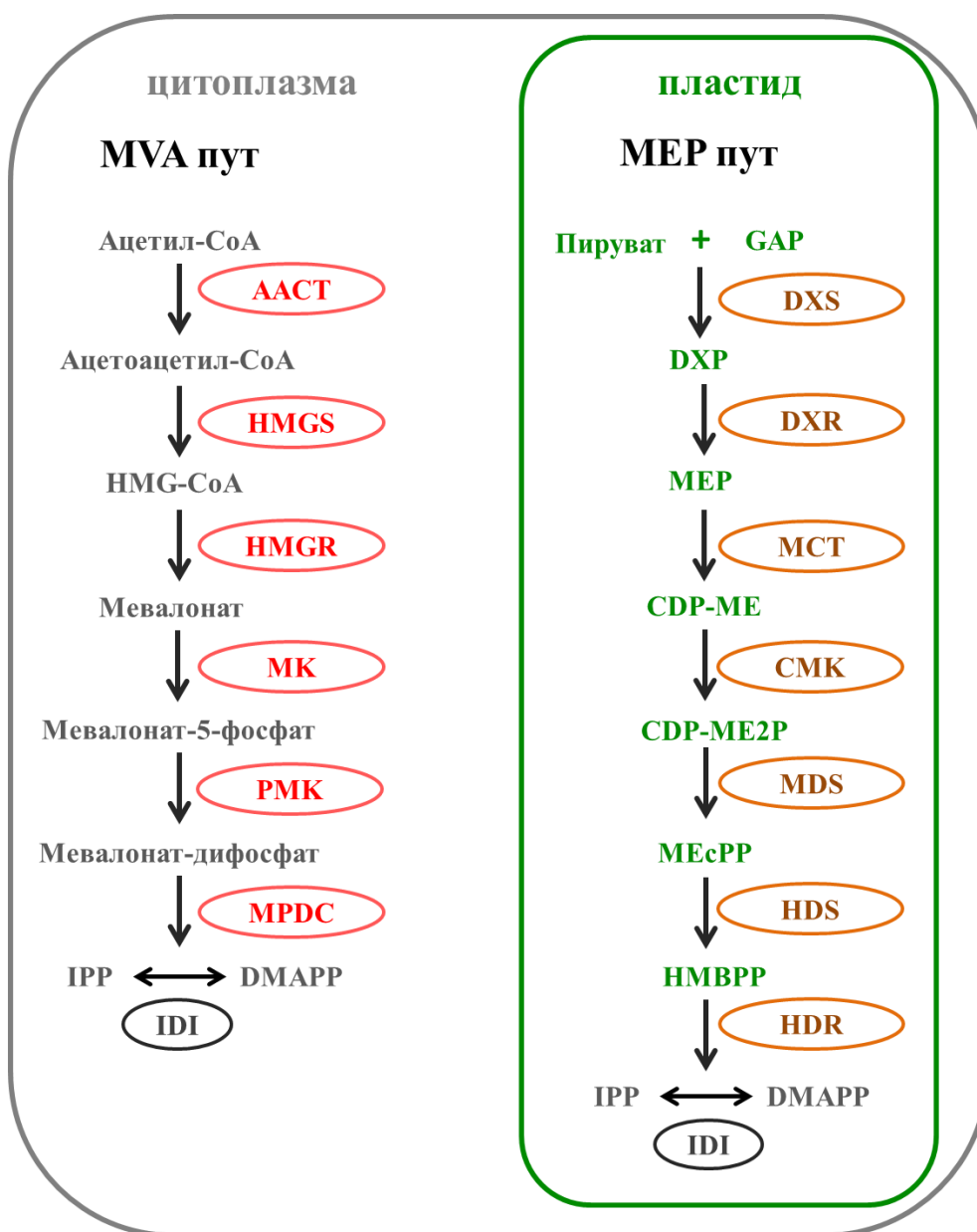
Терпени су најбројнија и структурно најразличитија група биљних природних производа (Croteau и сар., 2000) чија је улога у биљкама веома разнолика. Неки од њих су фотосинтетички пигменти (каротеноиди), регулатори растења (цитокинини, гибберелини) или компоненте мембрана (фитостероли). Сви терпени настају од универзалног прекурсора са пет угљеникових атома (C5) изопентенил дифосфата (*IPP*), и његовог изомера диметилалил дифосфата (*DMAPP*), који настају посредством два независна и просторно одвојена метаболичка пута у биљци.

У цитосолу *IPP* и *DMAPP* настају у мевалонатном (*MVA*) путу, а у пластидима у метилеритритол-фосфатном (*MEP*) путу (Слика 2).

***MVA* пут** код биљака започиње кондензацијом два молекула ацетил коензима А (*Ac-CoA*) до ацетоацетил коензима А (*AcAc-CoA*) у присуству ензима ацетоацетил коензим А тиолазе (ААСТ). У наредном кораку долази до кондензације *Ac-CoA* и *AcAc-CoA* и настаје хидрокси-метилглутарил коензим А (*HMG-CoA*) у реакцију коју катализује ензим *HMG-CoA* синтаза (HMGs). Дејством ензима *HMG-CoA* редуктазе (HMG-R) од *HMG-CoA* у два корака, у присуству *NADPH*, настаје мевалонат (*MVA*). Од *MVA* се синтетише *IPP* преко низа реакција које катализују ензими мевалонат киназа (МК), фосфомевалонат киназа (РМК) и дифосфомевалонат декарбоксилаза (MPDC).

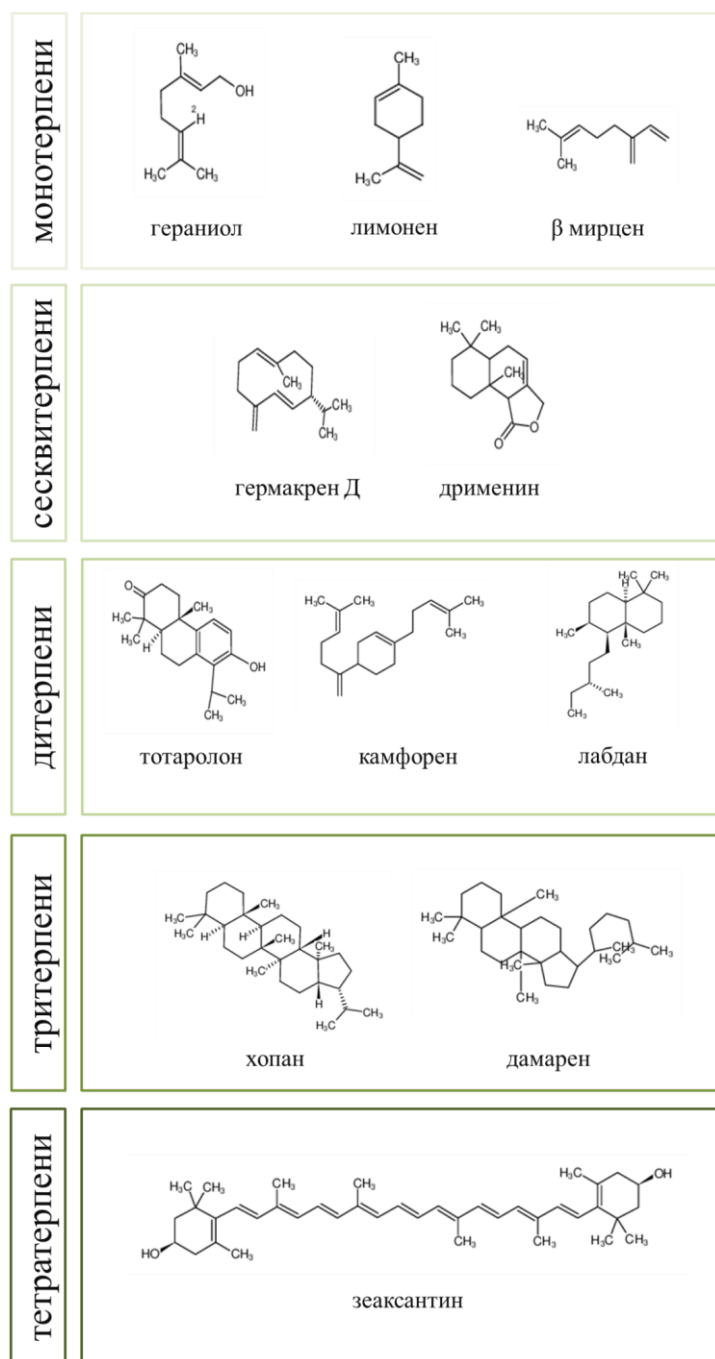
***MEP* пут** синтезе *IPP* је описан не само код биљака, већ и код неких бактерија и протозоа и укључује седам ензиматских реакција. Почетни корак овог биосинтетског пута представља синтеза дезоксисилулозо фосфата (*DXP*) од тиамин дифосфата (који настаје од пирувата) и глицералдехид-3-фосфата (*GAP*) у реакцију коју катализује ензим *DXP* синтаза (DXS). У оквиру биљних DXS издвајају се две групе. Прву чине ензими укључени у фотосинтезу, док друга група обухвата DXS које учествују у синтези специјализованих

метаболита (*Bouvier* и сар., 1998). У следећем кораку се синтетише *MEP* у реакцији коју катализује дезоксисулозо фосфат редуктоизомераза (*DXR*). *MEP* се даље конвертује у 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-еритритол (*CDP-ME*), а ову реакцију катализује 2-С-метил-D-еритритол 4-фосфат цитидил трансфераза (*МСТ*). Фосфорилација *CDP-ME* ензимом 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-еритритол киназом (*СМК*) доводи до продукције 2-фосфо-4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-еритритола (*CDP-ME2P*). Ензим 2-С-метил-D-еритритол 2,4-циклодифосфат синтаза (*МДС*) катализује циклизацију *CDP-ME2P*, при чему настаје 2-С-метил-D-еритритол 2,4-циклодифосфат (*MEcPP*). *MEcPP* се затим редукује до 4-хидрокси-3-метилбут-2-енилдифосфата (*HMBPP*) у реакцији коју катализује *HMBPP* синтаза (*HDS*). У последњој реакцији *MEP* пута дејством ензима *HMBPP* редуктазе (*HDR*) од *HMBPP* настају *IPP* и *DMAPP*.



Слика 2. Метаболички путеви синтезе терпена код биљака. Биосинтеза терпена се у биљкама одвија преко два метаболичка пута: *MVA* пут је цитосолни пут синтезе терпена, док се *MEP* пут одвија у хлоропластима.

Током биосинтезе терпена са више од пет угљеникових атома *IPP* се преводи у *DMAPP* под дејством ензима *IPP* изомеразе (*IDI*). Прерасподела интермеђијера између *MVA* и *MEP* биосинтетских путева терпена је могућа, али је ограничена. Изопренска јединица од 5 атома угљеника (*C5*) је основна градивна јединица терпена и она сама чини молекулу хемитерпена. Даља класификација терпена се заснива на броју изопренских јединица у молекулу, па тако од две изопренске јединице настају монтерпени (*C10*), од три-сесквитерпени (*C15*), и у даљем путу дитерпени (*C20*), сестерпени (*C25*), тритерпени (*C30*), тетратерпени (*C40*) и политерпени (*C_n*, *n*>40) (Слика 3).



Слика 3. Хемијске структуре представника основних група терпена

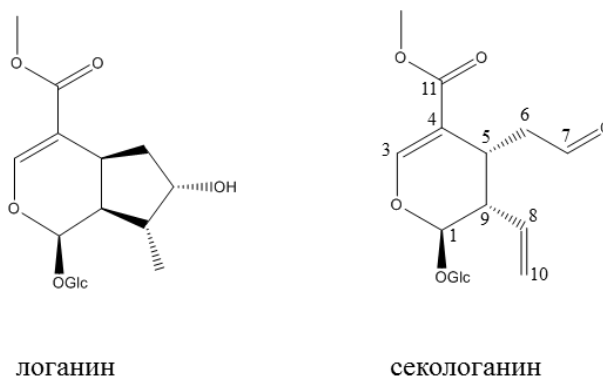
Најпознатији хемитерпен је изопрен, испарљива супстанца која се ослобађа из фотосинтезишућих ткива биљака (*Croteau* и сар., 2000). Монотерпени су компоненте цветова и етарских уља многих биљака; могу се изоловати дестилацијом и екстракцијом у различитим растварачима и често су главни састојци парфема и мирисних производа. Сесквитерпени се такође налазе у етарским уљима која показују значајан антимикробни потенцијал против патогених микроорганизама. Биљни хормон апсцисинска киселина (*ABA*, енг. *ABA - abscisic acid*) у погледу структуре припада сесквитерпенима, али се њен C15 прекурсор ксантоксин не синтетише директно спајањем изопренских јединица, већ цепањем C40 каротеноида (*Finkelstein*, 2013). Представници дитерпена могу бити примарни метаболити који регулишу растење и развиће биљке, као што су нпр. хормони гиберелини и алкохол фитол, док већина дитерпена спада у групу специјализованих метаболита са ограниченом дистрибуцијом у биљном царству (*Zerbe* и *Bohlmann*, 2015). Тритерпени, који најчешће настају повезивањем два C15 ланца, у биљкама су присутни у облику брасиностероида, као фитостеролне компоненте мембране и као компоненте биљних воскова (*Croteau* и сар., 2000). Биљни пигменти каротеноиди су најбројнија група биљних тетратерпена. Каротеноиди се састоје од 8 изопренских јединица и процењује се да их у природи има око 750 (*Takaichi*, 2013). Терпени од интереса за ову докторску дисертацију су монотерпени из групе секоиридоида, те ће у наставку бити више речи о овим једињењима.

1.1.1.1. Секоиридоиди

Велики број биљака из фамилија *Lamiaceae*, *Plantaginaceae*, *Caprifoliaceae*, *Gentianaceae*, *Oleaceae* и др., у својим ткивима продукује и акумулира биоактивне компоненте терпеноидног порекла из група иридоида или секоиридоида. Биљни иридоиди су на основу хемијске структуре подељени у три групе:

- негликозидни иридоиди (агликони, иридоиди који немају шећерну компоненту: иридодиал, иридомирмецин, непеталактон и др.),
- иридоидни гликозиди (поседују молекул шећера, најчешће глукозе, циклопентански прстен је затворен: дезоксилоганинска киселина, логанин, аукубин, каталпол и др.) и
- секоиридоиди (деривати секологанина, гликозиди: сверозид, генциопикрин, сверцијамарин, итд.).

Секоиридоиди су монотерпеноидни молекули чији се скелет заснива на циклопентан-С-пирану. Отварањем циклопентанског прстена између седмог и осмог угљениковог атома од иридоида настају секоиридоиди (Слика 4).



Слика 4. Хемијске структуре логанина и секологанина

Конверзија логанина (ЛОГ) у секологанин (СЛОГ) је реакција кључна за синтезу секоиридоида и индолних алкалоида код биљака које продукују ове метаболите. Секоиридоиди су у биљци ускладиштени у форми глукозида, при чему је β -D глукоза везана на позицији C1 за секоиридоидни скелет. До одвајања глукозе од секоиридоида може доћи киселом хидролизом или у ензиматској реакцији коју катализује ензим β -глукозидаза, при чему настају нестабилни али високореактивни агликони.

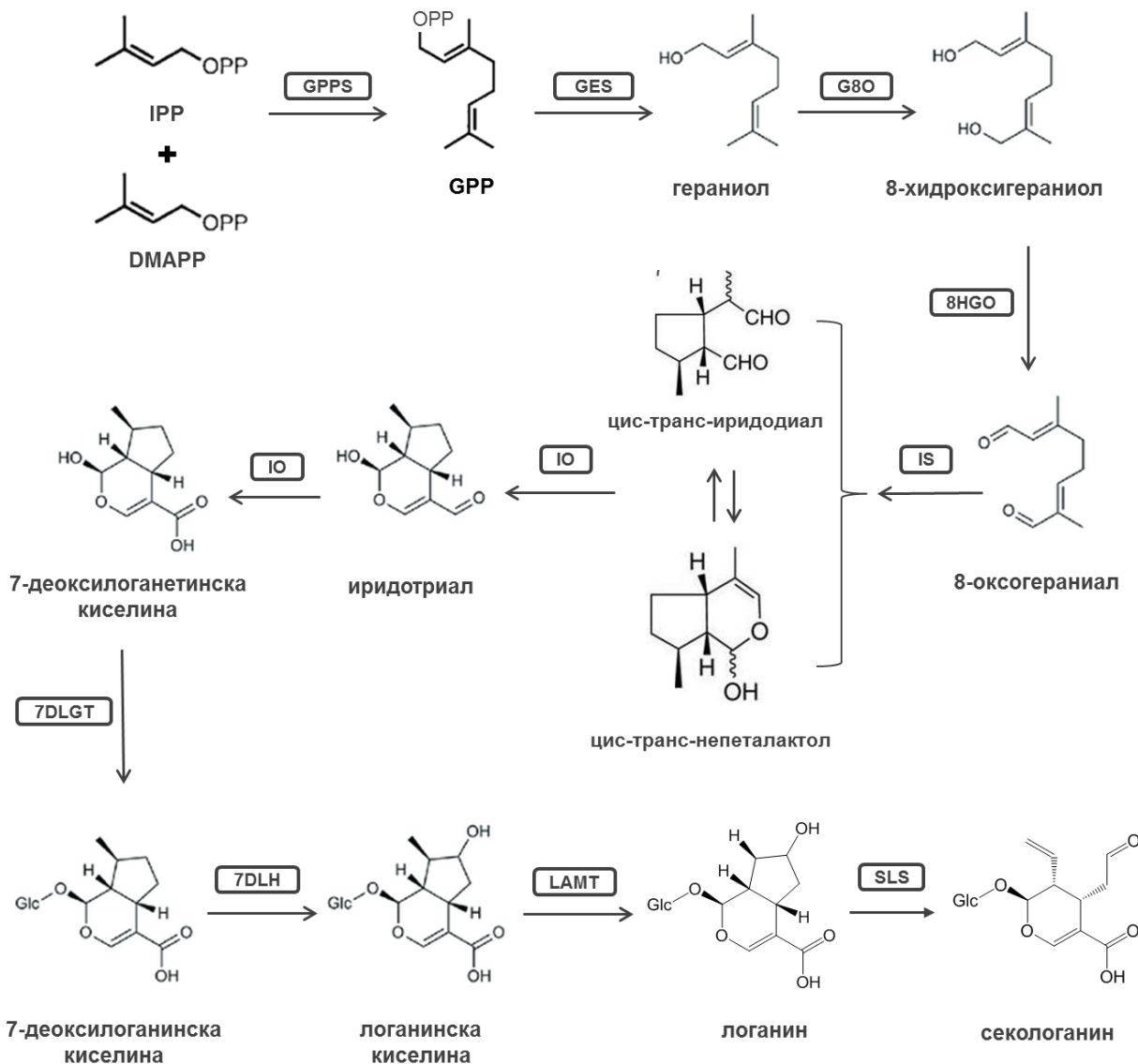
Основна улога секоиридоида у биљкама је заштита од напада патогена и хербивора, па се ови молекули у највећој мери синтетишу и складиште у најизложенијим деловима биљке - листовима и цветовима (*Koudounas* и сар., 2015; *Liu* и сар., 2017). Због свог горког укуса и изражених биоактивних својстава (антимикробно, антиоксидативно, и сл.) секоиридоиди представљају детеренте за патогене и хербиворе и чине незаменљиву компоненту одбрамбеног одговора биљака.

1.1.1.2. Биосинтеза секоиридоида

Биосинтеза свих секоиридоида почиње синтезом универзалног прекурсора СЛОГ. Биосинтетски пут СЛОГ је детаљно описан код врсте *Catharanthus roseus* и обухвата око 10 реакција оксидације, редукције, циклизације, гликозилације и метилације (Слика 5).

Први корак биосинтетског пута секоиридоида је синтеза монотерпеноида геранил дифосфата (*GPP*) који настаје од *IPP* и *DMAPP* у реакцији коју катализује ензим *GPP* синтаза (*GPPS*). Једињење које настаје током следећег корака биосинтезе секоиридоида је алкохол гераниол у реакцији коју катализује ензим гераниол синтаза (*GES*). Овај ензим је функционално окарактерисан код врсте *C. roseus* (*Simkin* и сар., 2013). Следеће једињење у биосинтетском путу је 8-хидроксигераниол који настаје од гераниола активношћу ензима гераниол 8-оксидазе (*G8O*). Овај ензим (*G8O*) је функционално окарактерисан код врсте *C. roseus* под именом гераниол-10-хидроксилаза (*G10H*) (*Collu* и сар., 2001). Ензим *G8O* припада фамилији цитохром *P450* монооксигеназа и повезан је са цитохром *P450* редуктазом која захтева присуство *NAD(P)H* за своју активност. Ензим 8-хидроксигераниол оксидоредуктаза (*8HGO*) оксидује 8-хидроксигераниол до алдехида 8-оксогераниала, при чему настају још два продукта - 8-оксогераниол и 8-хидроксигераниал у присуству *NADP*. Наредни корак у биосинтези СЛОГ подразумева циклизацију 8-оксогераниала при чему се формира циклопентански прстен и први иридоид у овом биосинтетском путу - иридоидиал. Ензим који катализује ову реакцију је иридоид синтаза (*IS*), ензим из фамилије прогестерон-5- β -редуктаза који је окарактерисан код врсте *C. roseus* (*Geu-Flores* и сар., 2012; *Kries* и сар., 2016). У присуству *NAD(P)H* *IS* конвертује 8-оксогераниал до цис-транс-непеталактола/иридоидиала. Ензим иридоид оксидаза (*IO*) катализује реакцију синтезе 7-деоксилоганетинске киселине преко иридоидиала, на коју се затим додаје молекул глукозе у реакцији коју катализује ензим глукозилтрансфераза 7-деоксилоганетинске киселине (*7DLGT*), при чему настаје 7-деоксилоганинска киселина (*Miettinen* и сар., 2014). У наредном кораку се синтетише логанинска киселина (*ЛК*) у присуству ензима хидроксилазе 7-деоксилоганинске киселине (*7DLH*). *ЛК* се затим метилује до *ЛОГ* посредством метилтрансферазе *ЛК* (*LAMT*) (*Murata* и сар., 2008). Последњи корак у до сада описаном путу синтезе секоиридоида код врсте *C. roseus* укључује ензим СЛОГ синтазу (*SLS*) који оксидује *ЛОГ* у реакцији у којој настаје универзални прекурсор секоиридоида код биљака – СЛОГ (*Irmeler* и сар., 2000). Ензими *7DLH* и *SLS* такође припадају групи ензима цитохром *P450* монооксигеназа. Гени који учествују у синтези терпена преко *MEP* пута експримирани су у *IPAP* ћелијама (енг. *IPAP*- *internal phloem associated parenchyma*), док је експресија гена који учествују у последњим корацима биосинтезе секоиридоида карактеристична за ћелије

епидермиса. Висока експресија гена *GES*, *G8O*, *8HGO*, *IS*, *IO*, *7DLGT* и *7DLH* у *IPAP* ћелијама активира одговарајуће гене биосинтетског пута и синтетише се ЛК (*Asada* и сар., 2013). ЛК се затим транспортује у ћелије епидермиса у којима се експримирају гени *LAMT* и *SLS*, па се из ЛК преко ЛОГ, синтетише СЛОГ.



Слика 5. Пут синтезе секоидридоида секологанина (СЛОГ) код врсте *C. roseus*. Приказана су претпостављена једињења и ензими који посредују у биосинтези. Скраћенице: *IPP*-изопентенил пирофосфат, *DMAPP*-диметилалил пирофосфат, *GPP* геранил дифосфат, *GPPS* геранил дифосфат синтаза, *GES* гераниол синтаза, *G8O* гераниол 8-оксидаза, *8HGO* 8-хидроксигераниол оксидоредуктаза, *IS* иридоид синтаза, *IO* иридоид оксидаза, *7DLGT* глукозил трансфераза 7-деоксилоганетинске киселине, *7DLH* хидроксилаза 7-деоксилоганинске киселине, *LAMT* О-метилтрансфераза логанинске киселине, *SLS* СЛОГ синтаза.

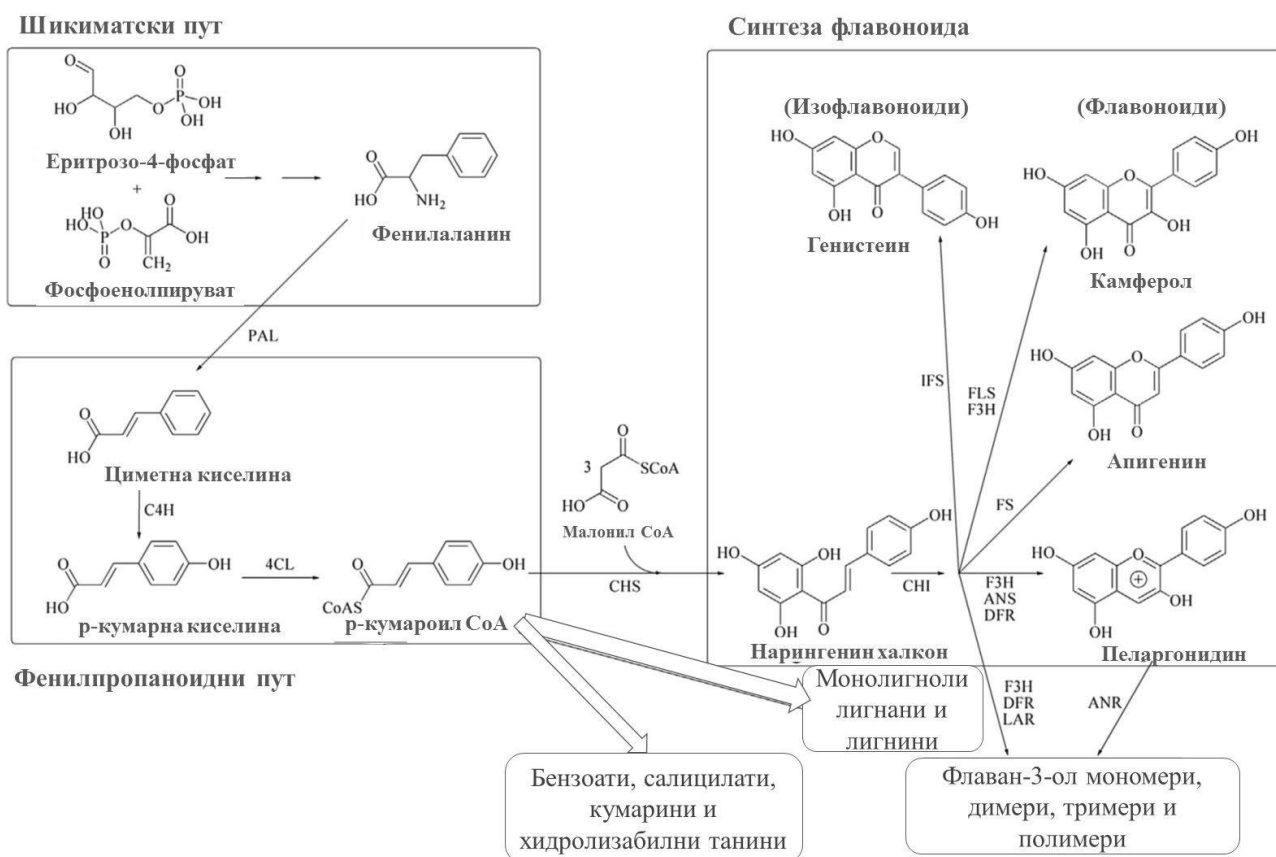
Даљи пут конверзије СЛОГ код биљака из фамилије *Gentianaceae* није истражен, али се сматра да је секоидридоидни глукозид сверозид (СВ) прекурсор синтезе свих осталих секоидридоида (*Jensen* и *Schripsema*, 2002).

1.1.2. Фенолна једињења – класификација и биосинтеза

Фенолна једињења су бројна група специјализованих метаболита који су универзално присутни у биљном царству. Функција фенола у биљкама је различита, па нека од ових једињења учествују у одбрани од хербивора и патогена, док су друга део антиоксидативне или *UV* заштите. Структура фенолних једињења се заснива на ароматичном прстену за који су везане једна или више хидроксилних група, а најједноставнији пример је сам фенол (C_6H_5OH). Полифеноли су једињења која садрже више од једног ароматичног прстена за које је везана једна или више хидроксилних група. У биљкама се феноли могу наћи у форми агликона, а веома често у форми гликозида као метиловани и хидроксиловани молекули (*Harborne* и *Williams*, 2000). Постоје различите класификације фенола. На основу броја угљеникових атома у молекулу феноли се класификују у тринаест група (*Lattanzio*, 2013):

- C6: једноставна фенолна једињења и бензохинони;
- C6-C1: фенолне киселине и алдехиди;
- C6-C2 фенилсирћетне киселине и ацетофенони;
- C6-C3 хидроксициметне киселине, кумарини, фенилпропани и хромони;
- C6-C4 нафтохинони;
- C6-C1-C6 ксантони;
- C6-C2-C6 стилбени и антрахинони;
- C6-C3-C6 флавоноиди, изофлавоноиди, неофлавоноиди;
- (C6-C3-C6)_{2,3} бифлавоноиди, трифлавоноиди, проантоцијанидини и њихови димери и тримери;
- (C6-C3)₂ лигнани и неолигнани;
- (C6e-C3)_n лигнини;
- (C6)_n катехол меланини и флоротанини;
- (C6-C3-C6)_n кондензовани танини.

Шикиматски пут синтезе фенолних једињења је најчешћи пут синтезе фенола код биљака. Овај пут је, осим код биљака, описан и код гљива и бактерија и обухвата седам метаболичких корака током којих од фосфоенолпирувата (*PEP*) и еритрозе 4-фосфата настаје шикимска киселина. Шикимска киселина се даље конвертује у хоризмат који је прекурсор синтезе ароматичних аминокиселина фенилаланина, тирозина и триптофана (*Herrmann* и *Weaver*, 1999). Ове аминокиселине су основни молекули од којих се наставља синтеза великог броја специфичних фенолних једињења. Од фенилаланина се у фенилпропаноидном путу синтетишу циметна киселина и *p*-кумарна киселина, које се касније преводе до лигнана, лигнина и кумарина. *p*-кумарна киселина је прекурсор синтезе кумароил-*CoA* од кога се синтетишу различити флавоноиди, изофлавоноиди и проантоцијанидини (Слика б). Тирозин је прекурсор синтезе алкалоида морфина, као и беталаина и лигнина (*Schenck* и *Maeda*, 2018), а од триптофана настају индолни алкалоиди и биљни хормони ауксини (*Mano* и *Nemoto*, 2012). Синтеза флавоноида у биљкама одвија се преко фенилпропаноидног пута који почиње кондензацијом три молекула малонил-*CoA* и једног молекула 4-кумароил-*CoA*, при чему настаје халконски скелет. Дејством ензима халкон изомеразе (СН) настаје нарингенин од кога се у даљем путу биосинтезе формирају флавоноиди (*Koes* и сар., 1994; *Petrussa* и сар., 2013).



Слика 6. Схематски приказ синтезе фенилаланина и његових деривата у биљкама. Скраћенице: PAL фенилаланин амонијум лиаза, С4Н цинамат-4-хидроксилаза, 4СЛ 4-кумароил СоА-лигаза, СНС хидроксицинамоил трансфераза, С3Н *p*-кумарат-3-хидроксилаза, СНС халкон синтаза, СНІ халкон изомераза, ANS антоцијанидин синтаза, DFR дихидрофлавонол редуктаза, FS флавоон синтаза, FLS флавонол синтаза, F3Н флаванон 3-хидроксилаза, IFS изофлавоон синтаза, ANR антоцијанидин редуктаза, LAR леукоантоцијанидин редуктаза (према *Cheunier* и сарадницима (2013), измењено).

1.2. Биолошка активност специјализованих метаболита

Употреба биљака и производа биљног порекла позната је у традиционалној медицини многих народа. Развојем техника идентификације и изолације биљних продуката дошло се до закључка да су управо специјализовани метаболити једињења која поседују лековита или токсична својства која се приписују одређеним биљним врстама. Предност коришћења биљних производа у односу на комерцијалне производе и лекове огледа се, између осталог, и у мањем штетном ефекту на околину и здравље људи. Третмани различитих здравствених поремећаја се и у модерно доба ослањају на биолошки активне специјализоване метаболите који су потенцијални извор нових фармацеутских производа.

1.2.1. Антиоксидативна активност

Слободни радикали су атоми или молекули који поседују један или више неспарених електрона у својој структури што их чини веома реактивним. У слободне радикале се

убрајају реактивне врсте кисеоника, као што су супероксид ањон радикал (O_2^-), хидрокси радикал (OH^\cdot), перхидрокси радикал (HO_2^\cdot), али и нерадикалске врсте кисеоника као што су синглет кисеоник (1O_2) и водоник пероксид (H_2O_2). Поред реактивних врста кисеоника слободне радикале и нерадикалске врсте формирају и хемијски елементи азот, бром и хлор (Nespolo, 2017). Слободни радикали у људском организму настају током нормалних физиолошких процеса и са већим интензитетом у условима стреса. Код здравог организма продукција слободних радикала је у равнотежи са продукцијом антиоксиданаса који их неутралишу. Међутим, уколико се ова хомеостаза наруши, слободни радикали доводе до оксидативног оштећења биомолекула као што су ДНК, липиди и протеини. Овако настала оштећења могу бити узрочници настанка бројних обољења, као што су обољења кардиоваскуларног система, дијабетес, канцер и других (Dhalla и сар., 2000; Ziech и сар., 2011; Newsholme и сар., 2016).

Према дефиницији коју је дао Halliwell (2007) антиоксиданси су једињења која одлажу, спречавају или уклањају оксидативна оштећења циљаних молекула. Антиоксиданси у ћелији могу бити ензиматског (ензими: супероксид дисмутазе, глутатион пероксидазе и каталазе) и неензиматског порекла (нпр. аскорбинска киселина, каротеноиди, флавоноиди). Антиоксиданси у људском телу смањују количине реактивних врста кисеоника, прекидају реакције липидне пероксидације и хелирају јоне метала. Неензиматски антиоксиданси се у организам уносе посредством хране или лекова, а многе биљне врсте представљају егзогени извор антиоксиданаса. Процењено је да је две трећине биљних врста на свету значајно за медицину, а већина ових биљних врста поседује антиоксидативни потенцијал (Krishnaiah и сар., 2011). Антиоксидативни потенцијал биљних производа зависи од неензиматских антиоксиданаса које биљке синтетишу, а неки од примера су аскорбинска киселина, глутатион и велики број специјализованих метаболита. Највећи број секундарних метаболита са антиоксидативним дејством по хемијској структури припада фенолима. Антиоксидативни капацитет фенолних једињења зависи од броја и положаја хидрокси група и супституената на ароматичном прстену. Фенолне киселине (гална, сиригинска, *p*-хидроксибензоева, итд.) и флавоноиди (кверцетин, апигенин, лутеолин, камферол и многи други) као најбројније групе биљних фенола испољавају значајан антиоксидативни капацитет (Heleno и сар., 2015; Yashin и сар., 2017). Флавоноиди инактивирају реактивне врсте кисеоника својом хидрокси групом и превode их у стабилан облик кисеоника (Panche и сар., 2016). Представници флавоноида епикатехин и лутеолин испољавају антиоксидативни ефекат тако што инхибирају ксантин оксидазу, ензим неопходан за синтезу реактивних врста кисеоника (Hanasaki и сар., 1994). Терпени као што су моно- и сесквитерпени такође показују значајан антиоксидативни потенцијал (Gonzales-Burgos и Gomez-Serranillos, 2012). Постоје различите методе за процену антиоксидативног потенцијала биљних екстраката, док *in vitro* тестови представљају један од првих корака у истраживањима потенцијалне антиоксидативне активности биљних производа.

1.2.2. Антимикробна активност

Напретком фармацеутске индустрије расте број доступних антиботика значајних у борби против патогених микроорганизама. Међутим, у модерно доба услед неконтролисане употребе антибиотика и способности микроорганизама да мутирају све више расте и отпорност многих сојева микроорганизама на синтетичке антибиотике. Сваке године од последица резистенције бактеријских сојева на различите лекове у земљама Европске Уније умре око 25000 људи (Freire-Moran и сар., 2011). Бројни клинички изолати сојева *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes* и *Mycobacterium tuberculosis* сматрају се отпорним на већину комерцијално доступних антибиотика (Sibanda и Okoh, 2007). Сојеви

Bacillus cereus и *Listeria monocytogenes* изоловани из хране такође показују отпорност према бројним синтетичким антибиотицима (Chaves и сар., 2011; Olaimat и сар., 2018). Овај глобални проблем усмерио је многа истраживања ка употреби природних производа са антибиотским потенцијалом, пре свега ка фармаколошки значајним биљкама.

Биљке су богат извор великог броја специјализованих метаболита укључујући танине, терпене, алкалоиде, флаване и флавоноиде који испољавају снажан антимикуробни потенцијал (Lewis и Ausubel, 2006). Једињења из групе терпена су фармаколошки активни производи биљног метаболизма који могу имати примену у борби против бактерија, али и гљива, вируса и протозоа (Chandra и сар., 2017). Поред антибиотског дејства биљни производи, пре свега етарска уља, показују и антифунгални ефекат. Етарска уља родова *Thymus* и *Mentha* испољавају снажан антифунгални ефекат према патогеним микрогљивама (Soković и сар., 2009). Механизми деловања специјализованих метаболита биљака на микроорганизме се повезују са хемијском природом метаболита. Показано је да терпени доводе до поремећаја пропустљивости ћелијске мембране и у неким случајевима нарушавају функцију митохондрија (Freiesleben и Jager, 2014). Алкалоиди нарушавају интегритет ћелијских мембрана и то кроз интеракцију са ергостеролом (Freiesleben и Jager, 2014). Такође, поседују способност уметања у молекулу ДНК што доводи до поремећаја у ћелијским деобама и евентуално до ћелијске смрти. Алкалоиди харман и берберин на овај начин испољавају антимикуробни ефекат (Phillipson и O'neill, 1989). Антимикуробни ефекат флавоноида према бројним бактеријама и патогеним гљивама последица је деловања флавоноида на ћелијску мембрану патогена (Lambert и сар., 2001). Флавоноиди интерагују са мембранским протеинима и тиме повећавају пермеабилност и нарушавају интегритет мембране патогена. Специјализовани метаболити биљака поред ефекта на мембране патогена утичу на ћелијске процесе као што су синтеза ДНК, РНК и протеина. Изофлавоон генистеин инхибира синтезу ДНК, РНК и протеина код грам-негативне, биолуминисцентне бактерије *Vibrio harveyi* (Ulanowska и сар., 2006). Вербаскозид изолован из врсте *Buddleja cordata* инхибира синтезу протеина *Staphylococcus aureus* (Guillermo Avila и сар., 1999). Кумарини редукују ниво ћелијске респирације, док танини утичу на мембране микроорганизама и инхибирају активност протеина (Chung и сар., 1998; Cowan, 1999). Познати биоактивни биљни природни продукт тимол доводи до промена у структури спољашње и унутрашње мембране микроорганизама тако што реагује са поларним „главама“ фосфолипидног двослоја што мења пермеабилност и утиче на дезинтеграцију мембране (Lambert и сар., 2001). Поред тога, тимол може да регулише експресију гена укључених у синтезу мембранских протеина, да инхибира активност протеина укључених у заштиту од топлотног стреса, утиче на синтезу молекула аденозин трифосфата (АТФ), итд. (Horváth и сар., 2009; Di Pasqua и сар., 2010).

Антимикуробна активност биљних природних производа зависи од њиховог хемијског састава, при чему све појединачне компоненте сложених смеша доприносе биоактивности у одређеној мери. Често је случај да смеше биоактивних једињења у биљним производима поседују јаче антимикуробно дејство у поређењу са појединачним компонентама смеше, што се објашњава интеракцијом компоненти смеше у виду синергизма (Kan и сар., 2006; Wagner и Ulrich-Merzenich, 2009). Код етарских уља, која представљају смеше специјализованих метаболита, потврђен је синергистички ефекат појединачних компоненти у бројним студијама (Dilika и сар., 2000; Galindo и сар., 2010).

1.3. Улога специјализованих метаболита у одбрамбеном одговору биљака на абиотички стрес

Због сесилног начина живота биљке су изложене различитим стресогеним факторима у својој животној средини. Једна од најширих дефиниција стреса јесте да стрес представља стање биолошког система које одступа од оптимума. Стресогени фактори могу бити абиотичког и биотичког порекла, при чему биотички стрес подразумева негативан утицај који на биљку има деловање неког другог организма, док се абиотички стрес дефинише као неповољан утицај физичких и хемијских фактора из спољашње средине. Недовољна количина воде и повећана концентрација соли на станишту, прекомерна инсолација и екстремне температуре само су неки од абиотичких фактора који нарушавају нормално растење и развиће биљке (*Wang и сар.*, 2003). У природним условима честа је појава да на биљку истовремено делује два или више стресогених фактора, па је тако, на пример, ефекат суше често праћен и ефектом повишеног салинитета. Многи абиотички фактори, укључујући сушу и високе температуре, често доводе до нарушавања одбрамбених механизма биљке и до лакшег продирања патогена, након чега се испољава ефекат симултаног дејства абиотичког и биотичког стреса (*Atkinson и сар.*, 2013).

Одговор биљке на стрес започиње активацијом различитих сигналних путева и одбрамбених механизма који подразумевају промене у транскрипционој контроли и активацији гена за успостављање хомеостазе и поправљање оштећења насталих дејством стресогених фактора. Абиотички стрес активира мембрански везане рецептор киназе након чега секундарни преносиоци сигнала, као што су реактивне врсте кисеоника и инозитол фосфати, утичу на промене у концентрацији унутарћелијског калцијума. Ова промена иницира каскаду фосфорилације протеина који су директно укључени у заштиту ћелије или оних који контролишу специфичне сетове гена и који се активирају под дејством стресогених фактора (*Shao и сар.*, 2007). Гени чија се експресија може индуковати стресом подељени су у две групе. Прву групу чине гени који кодирају за продукте који директно учествују у заштити ћелије, као што су LEA (енг. *late embryogenesis abundant*) протеини, осморегулатори, протеини топлотног шока (енг. *heat shock protein*) и протеини који спречавају смрзавање (енг. *anti-freezing protein*). Друга група су гени који кодирају за продукте укључене у регулацију експресије гена и преноса сигнала, као што су транскрипциони елементи MAP и CDP киназа, bZIP и MYB транскрипциони фактори и др. (*Shao и сар.*, 2007).

1.3.1. Повреда као врста абиотичког стреса

Повреда биљака изазвана нападом хербивора и инсеката или под утицајем абиотичких фактора спољашње средине (ветар, киша и др.) доводи до нарушавања интегритета ткива и биљних органа и истовремено отвара пут за губитак нутријената и инвазију патогена. Специфичне биљне структуре које имају функцију заштите од оштећења ткива обухватају епикутикларне воскове и анатомске творевине као што су трихоме и модификације изданака (трње, бодље и сл.) које инсектима и хербиворима отежавају приступ. Као одговор на напад патогена и хербивора биљке често синтетишу специјализоване метаболите међу којима и специфична токсична једињења као што су иридоидни глукозиди (*Pankoke и сар.*, 2013), глукозинолати (*Winde и Wittstock*, 2011), алкалоиди (*War и сар.*, 2012) и танини (*Barbehenn и Constabel*, 2011). Одговор биљака који подразумева појачану синтезу специфичних хемијских компоненти је најчешће енергетски захтеван и неисплатив процес и зато се активира само када је то неопходно (*León и сар.*, 2001). Слично као у случају

повређивања ткива од стране хербивора, механичка повреда иницира појачану синтезу специјализованих метаболита укључених у одбрамбени одговор биљке (*Mithöfer* и сар., 2005). Претпоставља се да након напада хербивора долази до интензивније синтезе специјализованих метаболита него у случају механичких повреда ткива, што се објашњава хемијским интеракцијама између хербивора и биљке (*Maffei* и сар., 2007). Напад хербивора и механичка повреда листа кукуруза доводе до акумулације јасмонске киселине и специјализованих метаболита из групе бензоксазиноида који учествују у одбрамбеном одговору биљке (*Malook* и сар., 2019). Појачана синтеза монотерпенских индолних алкалоида (енг. *MIA - monoterpenoid indole alkaloids*) забележена је након повреде листа *C. roseus* ларвама *Manduca sexta* (*De Bernonville* и сар., 2017). *MIA* се акумулирају како у повређеним, тако и у дисталним листовима биљака, а гусенице које су се овим листовима храниле умиру, што потврђује одбрамбену улогу синтетисаних алкалоида. Повреда листова *Plantago lanceolata* ларвама лептира *Junonia coenia* изазива акумулацију иридоидних глукозида у повређеним и целим листовима боквице (*Darrow* и *Bowers*, 1999). До сличних резултата дошли су *Marak* и сарадници (2002а) испитујући ефекат биљног патогена *Diaporthe adunca* на продукцију иридоидних глукозида код *P. lanceolata*. Након продирања патогена у биљно ткиво садржај иридоидних глукозида расте у дисталним органима (листовима и корену), а највећи ниво достиже на месту инфекције (репродуктивно ткиво). Механичка повреда ткива у одређеној мери иницира одбрамбени одговор сличан оном који изазива повреда настала дејством хербивора и патогена (*Marak* и сар., 2002а). Истраживања *Bricchi* и сарадника (2010) су на примеру *Phaseolus lunatus* показала да и механичка повреда и напад хербивора иницирају одбрамбени одговор биљке, али хемијски сигнали пореклом из оралних секрета хербивора индукују рани одговор који при механичком повређивању изостаје. У истраживањима *Alves* и сарадника (2007) на врсти *Brugmansia suaveolens* показано је да и механичка повреда и повреда изазвана хербиворном врстом лептира *Spodoptera frugiperda* индукују акумулацију тропанских алкалоида. Концентрација тропанских алкалоида у биљном ткиву се повећава до 24 h након повреде, а затим садржај ових једињења опада до нивоа забележеног пре оштећења ткива. Сматра се да механичка повреда биљака доводи до индукције синтезе одређених хемијских компоненти баш као и у случају напада хербивора, при чему одговор биљке на повреду представља сложен процес који, између осталог, подразумева активацију молекуларних механизма специфичних за механичко оштећење биљног ткива - *DAMP* (енг. *damage associated molecular patterns*) или напад хербивора - *HAMP* (енг. *herbivory associated molecular patterns*).

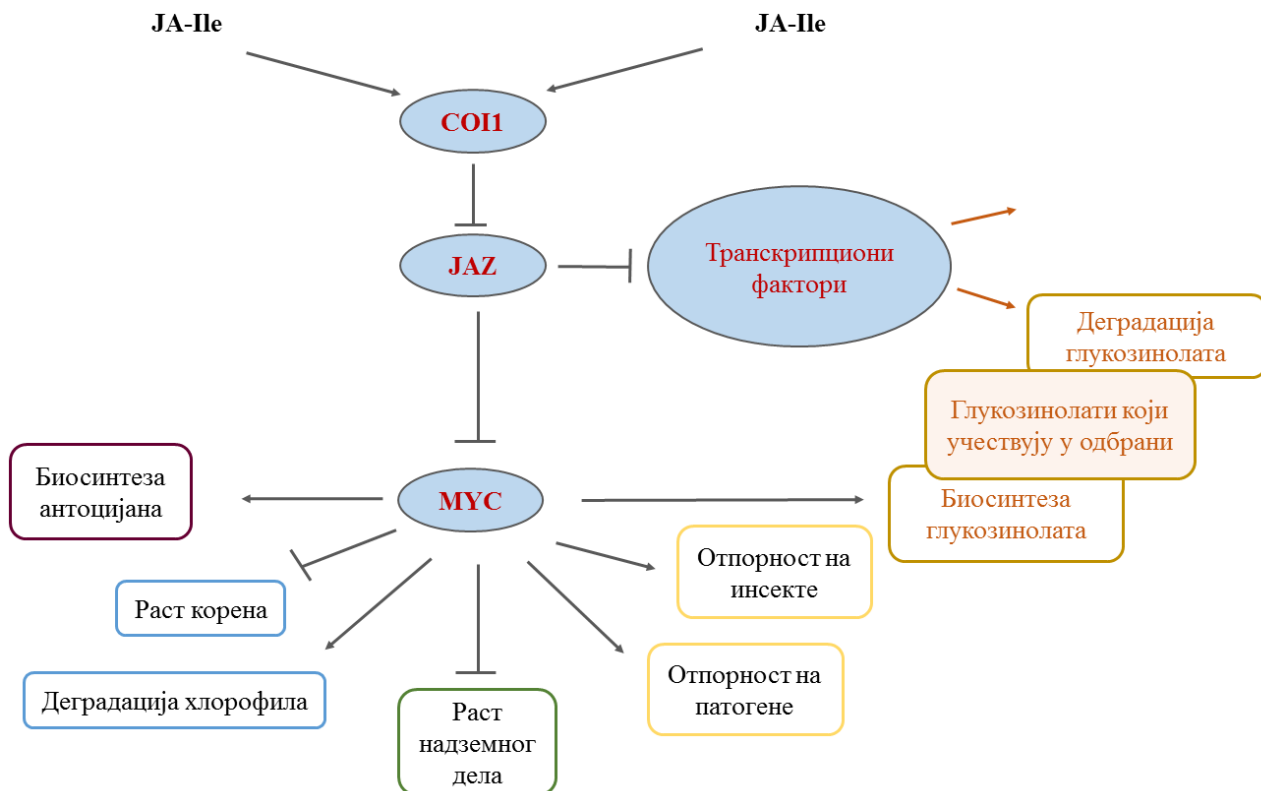
Одбрамбени механизми биљака се прво активирају на месту повреде (локални одговор), а након тога и у осталим деловима биљке (системски одговор). Реактивне врсте кисеоника, електрични сигнали и промене у концентрацији калцијума у цитосолу представљају главне (основне) компоненте информационе мреже која омогућава пренос сигнала у биљци (*Jacobo-Velázquez* и сар., 2015; *Toyota* и сар., 2018). Реактивне врсте кисеоника, супероксид анјон и синглет кисеоник, настају на месту повреде (*Prasad* и сар., 2020) и доводе до хиперполаризације плазма мембране која постаје пропустљива за јоне Ca^{2+} . Електрична компонента сигнала зависи од протеина сличних глутамату (енг. *glutamate receptor like proteins*, GLR) који припадају фамилији катјон-пермеабилних јонских канала. Код *Arabidopsis thaliana* GLR се активирају након механичке повреде и напада хербивора (*Toyota* и сар., 2018), што доводи до брзе промене у концентрацији цитосолног Ca^{2+} како на месту повреде, тако и у удаљеним листовима, као и до акумулације етилена и јасмонске киселине (*Delessert* и сар., 2004; *Wu* и *Baldwin*, 2009). Етилен није примарни елицитор одговора, већ је његова основна улога модулација сигнала који се преносе на јасмонску киселину (*Von Dahl* и *Baldwin*, 2007). Јасмонска киселина (енг. *JA - jasmonic acid*) и њени деривати се синтетишу из α -линоленске киселине у октадеканомидном путу (*Wasternack* и *Hause*, 2013) и регулишу

различите развојне процесе у биљци као што су фертилитет, издуживање корена и сазревање плодова (Maciejewska и Kopcewicz, 2002; Garrido-Bigotes и сар., 2018). Јасмонати су такође и сигнални молекули укључени у одговор биљке на абиотичке и биотичке факторе, као што су напад патогена и хербивора и механичка повреда биљке (Fernández-Calvo и сар., 2011; Wasternack и Hause, 2013; Fragozo и сар., 2014; Goossens и сар., 2016). Показано је да JA и њени деривати утичу на транскрипциону контролу гена који учествују у биосинтези специјализованих метаболита и на тај начин учествују у одговору биљке на стрес изазван механичким повредама или нападом патогена (Chini и сар., 2007). Транскрипционо профилисање 8200 гена врсте *A. thaliana* показало је да повреда утиче на промене у експресији око 8% анализираних гена, од којих око 20% кодира за протеине који учествују у преносу сигнала (Cheong, 2002). Слично истраживање спровели су Delessert и сарадници (2004) на 3500 гена *A. thaliana* од којих је 359 показало промене у експресији након повреде. Гени чија се експресија мења одмах након повреде реагују локално и системски; 35% ових гена је под контролом метил јасмоната (енг. MeJA - methyl jasmonate), док су гени који су укључени у метаболичке путеве део касног одговора. Акумулација јасмоната и бензоксаиноида у повређеним листовима кукуруза праћена је и системским одговором који подразумева акумулацију наведених компоненти и у листовима који нису повређени (Malook и сар., 2019).

1.3.1.1. Сигнални пут јасмонске киселине

Сигнални пут JA се активира формирањем коњугата JA и изолеуцина (*JA-Ile*), а који детектује ко-рецепторни комплекс састављен од протеина COI1 (енг. COI1 - coronatine insensitive 1) и JAZ (енг. JAZ - jasmonate zim-domain) (Fonseca и сар., 2009; Chini и сар., 2016). COI1 је F-box компонента SCF (енг. SCF - skip-cullin-F-box) комплекса. Овај комплекс је мултипротеин Е3 убиквитин лигаза за који се везује *JA-Ile* и JAZ протеин. У присуству *JA-Ile* долази до убиквитинације JAZ, након чега следи његова протеозомална деградација (Слика 7).

Примарна функција JAZ протеина је репресија bHLH (енг. bHLH - basic helix-loop-helix) транскрипционог фактора MYC2, који је један од основних регулатора сигналног пута JA (Chini и сар., 2007; Fernández-Calvo и сар., 2011). У одсуству *JA-Ile* MYC2 је физички блокиран JAZ протеином (Wasternack и Strnad, 2019). Везивање *JA-Ile* за COI1 - JAZ комплекс не само да доводи до деградације JAZ, већ и до ослобађања MYC2, што даље води ка активацији циљаних гена (Chini и сар., 2016; Wasternack и Strnad, 2019). Експресија специфичних биосинтетских гена монотерпеноидних индолних алкалоида у биљкама *C. roseus* контролисана је транскрипционим факторима означеним као BIS1 и BIS2 (енг. BIS - basic helix-loop-helix iridoid synthesis) (Van Moerkercke и сар., 2015). Гени укључени у синтезу стриктозидина код *C. roseus* налазе се под контролом ORCA транскрипционих фактора (енг. ORCA - octadecanoid derivative responsive catharanthus apetala domain). Транскрипциони фактор MYC2 активира ORCA2 и ORCA3 транскрипционе факторе који индукују експресију гена укључених у биосинтезу MIA код врсте *C. roseus* (Schweizer и сар., 2018). Повишена експресија гена за транскрипциони фактор ORCA4 води ка повећаној акумулацији индолних алкалоида код *C. roseus* (Paul и сар., 2016). Показано је да јасмонати могу да стимулишу експресију гена за BIS и ORCA транскрипционе факторе (Zhang и сар., 2011; Van Moerkercke и сар., 2015). JAM транскрипциони фактори (енг. JAM - jasmonate-associated MYC2-like) такође припадају групи bHLH транскрипционих фактора који су укључени у сигнални пут JA. Транскрипциони фактори JAM1, JAM2 и JAM3 показују велику сличност са MYC2 и делују као антагонисти MYC2 у сигналном путу JA (Sasaki-Sekimoto и сар., 2013).

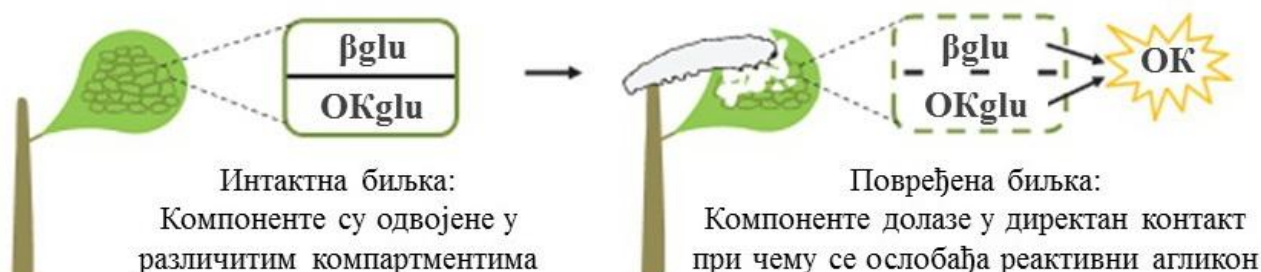


Слика 7. Модел сигналног пута јасмонске киселине током синтезе и деградације гликозинолата и антоцијана као и других *JA-Ile* зависних процеса. Приказана је модулаторна активност JAZ протеина ка различитим транскрипционим факторима као и позитивна и негативна регулација различитих процеса (према *Wasternack* и *Strnad* (2019), измењено).

1.3.1.2. Улога гликозилованих специјализованих метаболита у одбрамбеном одговору биљака на стрес повређивањем

Хемијска одбрана биљака од напада патогена и хербивора често подразумева учешће гликозилованих специјализованих метаболита и хидролитичких ензима који ова једињења преводe до активних агликаона. Двокомпонентни одбрамбени одговор који је присутан код неких биљака активира се повредом ткива и подразумева хидролизу гликозилованих једињења (алкалоиди, цијаногени и иридоидни гликозиди, гликозинолати) посредством биљних β -гликозидаза, при чему се ослобађају токсични, нестабилни и врло реактивни агликони. С обзиром да агликони могу бити токсични и за саме биљке, оне су током еволуције развиле бројне механизме који спречавају аутоксичност, а један од њих је физичко раздвајање гликозида и ензима који их активирају, односно њихово складиштење у различите ћелијске одељке. Многе биљке гликозиде складиште у стабилном и растворљивом облику у вакуолама (*Jones* и *Vogt*, 2001). Међу монокотиледоним и дикотиледоним биљкама постоје значајне разлике везане за субцелуларну локализацију β -гликозидаза. За монокотиле су специфичне β -гликозидазе које садрже *N*-терминални транзитни пептид и налазе се у пластидима, док су код дикотила β -гликозидазе смештене на ендоплазматичном ретикулуму или у апопласту (*Poulton*, 1990; *Geerlings* и сар., 2000; *Nikus* и сар., 2003; *Morant* и сар., 2008; *Roepke* и сар., 2017). Акумулација гликозида и одговарајућих хидролитичких ензима у великој мери зависи од развојног стадијума биљака, па је тако концентрација наведених

компоненти највиша у младим деловима биљке који су и најосетљивији на напад хербивора и патогена (*Forsslund* и сар., 2004; *Pankoke* и сар., 2015). Након оштећења биљног ткива долази до мешања глюкозилованих једињења и хидролитичких ензима β -глюкозидаза, чиме се стварају услови за одвијање деглукозилације и ефикасно ослобађање високо реактивних и токсичних агликона (Слика 8).



Слика 8. Двокомпонентни одбрамбени одговор биљке у коме се глюкозилована одбрамбена компонента (OKglu) активира у контакту са ензимом β -глюкозидазом (β glu) при оштећењу ткива повређивањем (напад хербивора). Након хидролизе OKglu ослобађа се одбрамбена компонента - реактивни агликон (OK) (према *Pentzold* и сарадници (2014), измењено).

Постоје бројни примери који описују двокомпонентни одбрамбени одговор код биљака. Главни продукт специјализованог метаболизма у корену врсте *A. thaliana* јесте скополин, дериват скополетина (из групе кумарина). Након хидролизе скополина под дејством β -глюкозидаза AtBGLU21, AtBGLU22 и AtBGLU23 ослобађа се токсично једињење скополетин које учествује у одбрамбеном одговору (*Ahn* и сар., 2010). Код врсте *C. roseus* након напада хербивора долази до хидролизе индолног алкалоида стриктозидина под дејством ензима стриктозидин β -глюкозидазе, а продукт ове реакције је високо реактиван диалдехид од кога се даље може синтетисати катенамин, главни прекурсор синтезе фармацеутски значајних метаболита виндолина, винбластина и катарантина (*Geerlings* и сар., 2000; *Guirimand* и сар., 2010). Врсте *Plantago lanceolata* и *P. major* продукују иридоидне глюкозиде каталпол и аукубин који заједно са β -глюкозидазама учествују у формирању двокомпонентног одбрамбеног одговора биљке на напад хербивора. Ларве хербиворне врсте *Amata mogadorensis* слабије напредују када се хране младим у односу на старије листове боквице управо због вишег садржаја иридоида у младим листовима наведене врсте (*Pankoke* и сар., 2013). Европска маслина продукује олеуропеин, глюкозид из групе секоиридоида који се активира под дејством β -глюкозидаза. Након хидролизе олеурпеина ослобађа се молекул глукозе који се даље укључује у синтезу антоцијана, као и агликон који поседује значајан антиоксидативни потенцијал (*Koudounas* и сар., 2015). Активацију олеуропина под дејством β -глюкозидазе описали су и *Konno* и сарадници (1999) код врсте *Ligustrum obtusifolium*. Продукт хидролизе олеуропина је молекул сличан глутаралдехиду који има способност денатурације протеина. Овај резултат *Konno* и сарадника (1999) такође подржава хипотезу да олеуропеин и β -глюкозидаза учествују у формирању двокомпонентног одбрамбеног одговора код врсте *L. obtusifolium* у циљу заштите биљке домаћина од напада патогена и хербивора.

1.4. β -глюкозидазе (ЕС 3.2.1.21) као битне компоненте одбрамбеног одговора биљака на абиотички стрес

Бета-глюкозидазе (β -глюкозидазе) представљају хетерогену групу ензима широко распрострањених у живом свету који катализују хидролизу гликозидних веза β -D-глюкозида и олигосахарида, при чему настаје терминални нередукуюћи остатак уз ослобађање глюкозе (Ketudat Cairns и сар., 2015). Ензими β -глюкозидазе припадају великој породици гликозидних хидролаза (енг. GH - *glycoside hydrolases*), које се на основу сличности аминокиселинских секвенци сврставају у 6 група: GH1, GH3, GH5, GH9, GH30 и GH116 (Ketudat Cairns и сар., 2015). Већина биљних β -глюкозидаза спада у групу GH1 која је уједно и најбројнија група GH код еукариота (http://www.cazy.org/GH1_eukaryota.html). *A. thaliana* има 48, *Oryza sativa* 38, а *Zea mays* 26 гена који кодирају за β -глюкозидазе (Xu и сар., 2004; Opassiri и сар., 2006; Gómez-Anduro и сар., 2011). Ензими β -глюкозидазе могу да хидролизују већи број супстрата, због чега су добили епитет „промискуитетних“ ензима, али се њихова тачна функција одређује према специфичном супстрату према коме имају највећи афинитет. Тако стриктозидин β -глюкозидаза врсте *C. roseus* најефикасније хидролизује супстрат стриктозидин који је главни интермедијер у биосинтетском путу индолних алкалоида (Geerlings и сар., 2000). Ензими β -глюкозидазе су механизмом повратне спреге често инхибирани продуктом сопственог деловања што се огледа кроз слабљење активности β -глюкозидазе услед пораста концентрације глюкозе која се ослобађа хидролизом сложених гликозида (Shewale, 1982). Riou и сарадници (1998) су описали различите форме β -глюкозидазе код филаментозне гљиве *Aspergillus oryzae* од којих је једна инхибирана глюкозом, а друга толерантна на високе концентрације глюкозе која се ослобађа у реакцији.

Ензими β -глюкозидазе у биљној ћелији поред улоге у хидролизи специјализованих метаболита након повреде ткива имају и друге функције. Једна од функција β -глюкозидаза је хидролиза гликозида монолигнола који се у процесу лигнификације уграђују у ћелијски зид. Лигнин је комплекс ароматичних алкохола који даје чврстину ћелијском зиду, пружа механичку потпору биљци и повећава отпорност ка савијању. Изграђен је од фенилпропаноидних јединица монолигнола: *p*-кумарил алкохола, кониферил алкохола и синапил алкохола који се у ћелији депонују у гликозилованој форми. Транспорт монолигнола кроз ћелију је регулисан активношћу два ензима - гликозил трансферазе и β -глюкозидазе. Истраживање које су спровели Marcinowski и Grisebach (1978) указало је на улогу β -глюкозидазе која хидролизује монолигнолске гликозиде код врсте *Picea abies*. Пре уградње у структуру лигнина гликозиловане форме монолигниола су депоноване у вакуоли. Дејством ензима β -глюкозидазе долази до хидролизе молекула глюкозе са фенилпропаноидног скелета и монолигноли се уграђују у ћелијски зид. Ова функција β -глюкозидаза има значаја и при санирању оштећења ћелијског зида биљака након дејства патогена или механичког повређивања (Dharmawardhana и сар., 1995; Opassiri и сар., 2006).

Ензими β -глюкозидазе у биљним ткивима такође имају значајну улогу у регулацији нивоа фитохормона. У биљним ћелијама и ткивима многи хормони се често налазе у свом неактивном гликозилованом облику, а специфични ензими попут β -глюкозидаза хидролизују ове гликозиде доводећи до формирања активних облика хормона. Тако је потврђено да током дехидратације *A. thaliana*, β -глюкозидаза (*AtBGLU1*) хидролизује неактивне глко-коњугате АВА након чега се повећава ниво активне АВА у биљној ћелији (Lee и сар., 2006; Xu и сар., 2012). Показано је да се гликозиловане форме АВА лакше транспортују кроз биљку, а када доспеју на жељену дестинацију β -глюкозидаза катализује одвајање глюкозе са остатка молекула, при чему се ослобађа активни облик АВА (Dietz и сар., 2000). Формирање активних

облика хормона ензиматском хидролизом њихових неактивних глюкозилованих облика потврђено је и за салицилну киселину (*Himeno* и сар., 2013), цитокиnine (*Brzobohaty* и сар., 1993) и гиберелине (*Hua* и сар., 2013).

1.4.1. β -глюкозидазе представника реда *Gentianales*

Гени за β -глюкозидазе окарактерисани су код појединих представника реда *Gentianales*, као што су *C. roseus* и *Rauvolfia serpentina* (*Geerlings* и сар., 2000; *Warzecha* и сар., 2000; *Barleben* и сар., 2007). Ови гени су успешно експримирани у *E. coli*, након чега су изоловани рекомбинантни протеини. Способност рекомбинантних протеина да хидролизују β -D-глюкозидну везу потврђена је на стандардним супстратима, као што су 4-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид, 4-нитрофенил- β -D-глюкозид, 6-бромо-2-нафтил- β -D-глюкозид и сл. Међутим, поред испитивања активности ензима уз помоћ комерцијалних супстрата неопходно је прецизно утврдити функцију протеина и њихову специфичност за супstrate присутне у самој биљци. Тако је хидролиза стриктозидина код врсте *C. roseus* пружила додатне информације о функцији β -глюкозидазе која је укључена у метаболички пут индолних алкалоида (*Geerlings* и сар., 2000). Наиме, овај ензим показује високу специфичност за хидролизу монотерпенског индолног алкалоида стриктозидина који се у биосинтетском путу синтетише преко СЛОГ. Код врсте *R. serpentina* функционално су окарактерисане стриктозин β -глюкозидаза и раукафрицин β -глюкозидаза које су специфичне за хидролизу индолних алкалоида стриктозидина и раукафрицина (*Warzecha* и сар., 2000; *Barleben* и сар., 2007).

1.4.2. β -глюкозидазе у реакцији са секоиридоидима

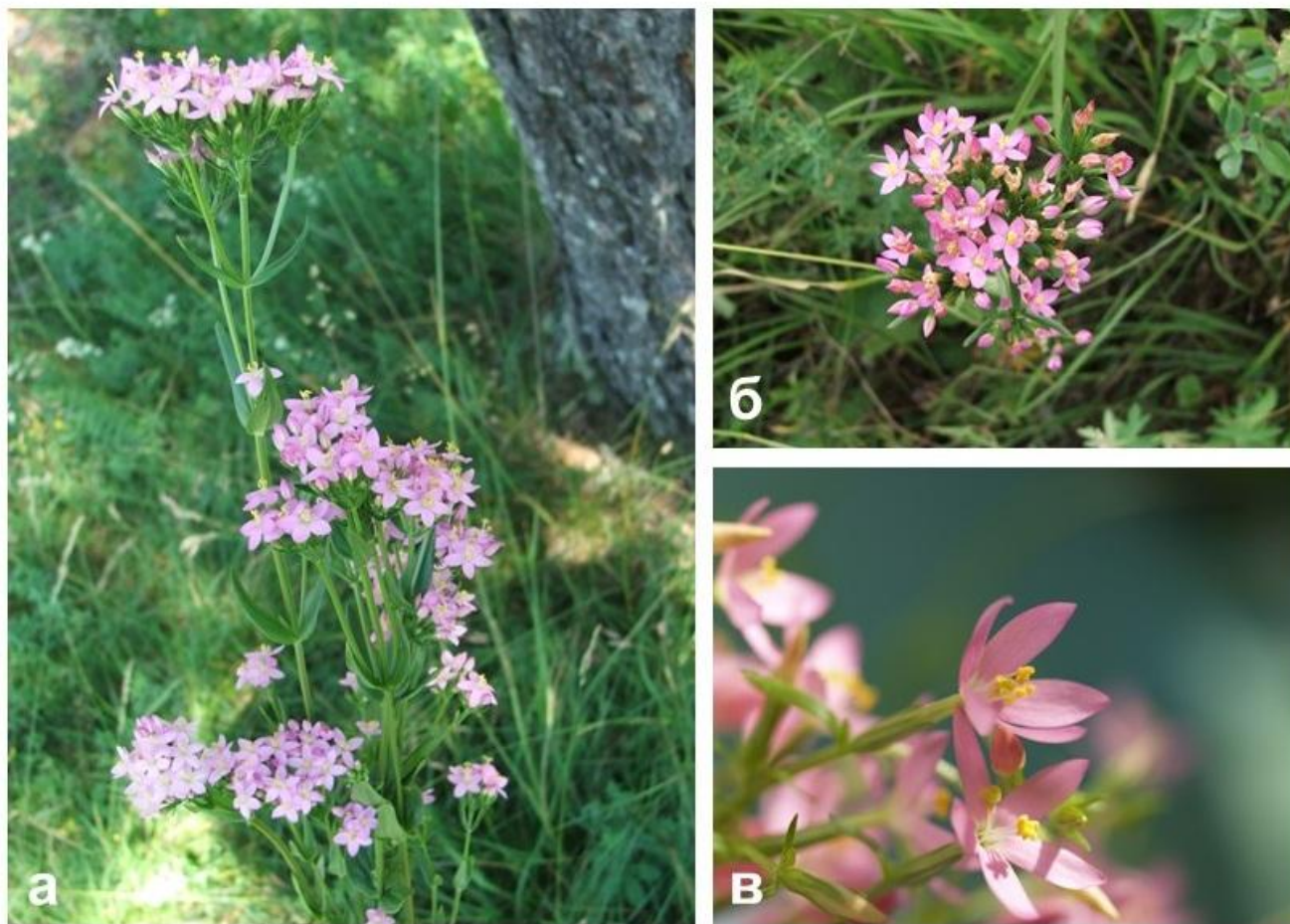
Сам процес хидролизе глюкозидног остатка са основног скелета молекула посредством β -глюкозидаза може значајно утицати на њихову биолошку активност. Ензиматском хидролизом сверцијамарина (СВМ) и генциопикрина (ГП) настају бројни агликони, као што су нпр. генцианин, генцианол, еритроцентаурин (ЕР) и други (*Fujii* и сар., 2019). Генцианин је фармаколошки активан метаболит који показује антиинфламаторни, антидијабетични и кардиопротективни ефекат (*Mansoor* и сар., 1998; *Vaidya* и сар., 2013; *Wenjin* и *Jianwei*, 2017), док ЕР испољава значајан антивирусни потенцијал (*Geng* и сар., 2015). Након хидролизе ГП под дејством β -глюкозидазе формиран агликони испољавају хепатопротективни ефекат (*Zeng* и сар., 2013). Познато је да агликони, као метаболички продукти секоиридоидних глюкозида, имају изражен антимикуробни ефекат. Присуство β -глюкозидаза значајно повећава антимикуробни потенцијал иридоидних глюкозида (*Van Der Sluis* и сар., 1983; *Marak* и сар., 2002b), па тако ГП само у присуству β -глюкозидазе показује токсични ефекат на гљиву *Penicillium expansum* (*Van Der Sluis* и сар., 1983).

Хидролиза фармаколошки значајних продуката биљног метаболизма може бити катализована деловањем различитих микроорганизама (*El-Sedawy* и сар., 1989, 1990; *Setchell*, 2000; *Otieno* и *Shah*, 2007). Поједини сојеви бактерија и гљива имају способност хидролизе глюкозида сопственим β -глюкозидазама, па се тако гљиве родова *Aspergillus* и *Penicillium* интензивно користе у комерцијалној производњи β -глюкозидаза за ефикасну хидролизу лигноцелулозне биомасе (*Dekker*, 1986; *Krogh* и сар., 2004). Већина микрогљива је развила ефикасне механизме против токсичног ефекта секоиридоидних глюкозида. У ове механизме се убраја и процес метаболичке трансформације токсичних компонената који подразумева хидролизу супстрата под дејством β -глюкозидаза. Биотрансформација ГП микрогљивом *Penicillium crustosum* доводи до продукције пет структурно различитих агликона (*Han* и сар.,

2014), док *Cordyceps sinensis* трансформише ГП до монотерпенских алкалоида (Wang и сар., 2007). У раду Jun и сарадника (2008) описан је механизам хидролизе СВМ под дејством гљиве *Aspergillus niger* до одговарајућих агликона, укључујући и ЕР.

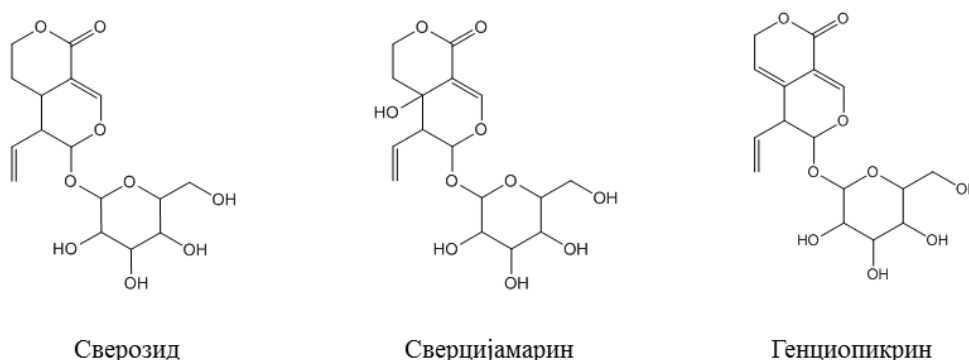
1.5. *Centaurium erythraea* Rafn - карактеристике и лековита својства

Centaurium erythraea Rafn је биљна врста из фамилије Gentianaceae (ред Gentianales), која поседује бројна лековита својства због којих је популарна у народној медицини многих земаља. Ареал распрострањења кичице обухвата северну хемисферу, па се ова врста може наћи у Европи, као и у деловима Азије и Северне Африке. Ова једногодишња или двогодишња зељаста биљка у народу носи име кичица, а у литератури се може наћи и под именима црвени кантарион, златна жуч и грозничавка. Кичица насељава отворена станишта, суве пашњаке, ивице шума, путеве и стазе од низијских до планинских предела до 1400 m надморске висине (Van Rossum, 2009). Стабло је високо 10-50 cm и при врху се грана. Листови су дугуљasti и наспрамни са израженом нерватуром и при дну стабла формирају розету. Ружичасти цветови су организовани у штитасте цвасти од око 50 цветова постављених у истој равни (Слика 9). Семе је ситно и бројно. Након пуцања чауре семе пада на земљу у непосредној близини биљке и нема специфичног начина расејавања (Ubsdell, 1979).



Слика 9. Биљна врста *C. erythraea* Rafn а) и б) хабитус биљака у цвету на природном станишту; в) изглед цвета (аутори фотографија: др Тијана Бањанац и др Бранислав Шилер)

Лековита својства кичице се приписују фармаколошки активним специјализованим метаболитима међу којима су најзаступљенији монотерпеноиди (секоиридоиди) и фенолна једињења (ксантони, фенолне киселине и флавоноиди) (*Aberham* и сар., 2011; *Banjanac* и сар., 2017). Секоиридоидни глукозиди горког укуса који су присутни у врстама из редова *Cornales*, *Dipsacales* и *Gentianales* се помињу као природни производи који имају примену у третману стомачних тегоба (*Ghisalberti*, 1998). Истраживања кардиоваскуларних тегоба која су спровели *Petkov* и *Manolov* (1978) показала су да секоиридоиди имају антиаритмични и спазмолитични ефекат. Такође, секоиридоиди различитих биљних врста имају изражену антитуморску активност (*Ishiguro* и сар., 1986; *Nozaka* и сар., 1989), као и значајан антибактеријски и антифунгални потенцијал (*Šiler* и сар., 2014; *Zhou* и сар., 2019). Главни продукти секундарног метаболизма кичице су секоиридоиди СВ, СВМ и ГП (*Šiler* и сар., 2012) (Слика 10). Ови горки глукозиди поседују значајне фармаколошке и биолошке активности. За СВ је показано да поседује значајну антидијабетичну, антиинфламаторну и аналгетичну активност (*Ryu* и сар., 2010; *Huang* и сар., 2016), док сверцијамарин испољава значајан антидијабетични, антиконвулзантни, аналгетични и антилипидемијски ефекат (*Vaijanathappa* и *Badami*, 2009; *Vaidya* и сар., 2009, 2013; *Vaijanathappa* и сар., 2020). Испитивања биолошке активности генциопикрина су показала да ово једињење поседује гастропротективни и антидијабетични потенцијал (*Rojas Molina* и сар., 2000; *Huang* и сар., 2016).



Сверозид

Сверцијамарин

Генциопикрин

Слика 10. Хемијска структура најзаступљенијих секоиридоидних глукозида кичице.

Истраживања *Banjanac* и сарадника (2017) показала су присуство фенолних киселина хидроксициметне и хидроксибензоеве киселине и њихових деривата у екстрактима *C. erythraea* (Слика 11). Деривати хидроксициметне киселине пронађени у екстрактима кичице су кофеинска, хлорогена, *p*-кумарна, синапинска, ферулинска и циметна киселина (*Valentão* и сар., 2001; *Marchyshyn* и *Stoyko*, 2014; *Banjanac* и сар., 2017). Од хидроксибензоєвих киселина идентификоване су гална, *p*-хидроксибензоєва, ванилинска и сиригинска киселина (*Dogan* и сар., 2010; *Banjanac* и сар., 2017). У истраживањима *Valentão* и сарадника (2001), *Stefkov* и сарадника (2014) и *Banjanac* и сарадника (2017) забележено је и присуство флавоноидних компонената у екстрактима *C. erythraea*. Кичица продукује лутеолин и апигенин из групе флавона, док су од флавонола присутни камферол, кверцетин и деривати ових једињења. Поред фенолних киселина и флавоноида *C. erythraea* синтетише и ксантонска једињења. Ова једињења су по структури слична флавоноидима и синтетишу се код биљака из шест биљних породица, укључујући *Gentianaceae* (*El-Seedi* и сар., 2009). Горки ксантони који су изоловани из биљака фамилије *Gentianaceae* налазе се у саставу различитих дијететских суплемената за побољшање апетита (*Negi* и сар., 2013). Такође, ксантони

Екстракти коренова и надземног дела кичице поседују значајну антимицробну и антиоксидативну активност, при чему надземни делови кичице показују јачи антиоксидативни потенцијал у поређењу са кореновима (*Šiler* и сар., 2014). Екстракти цветова кичице могу да неутралишу реактивне врсте кисеоника, као и да инхибирају активност ензима ксантон оксидазе што су у свом раду описали *Valentão* и сарадници (2001). Резултати истраживања *Dorđević* и сарадника (2017) указују на антидијабетични потенцијал кичице, па тако метанолни екстракт ове врсте помаже у заштити црвених крвних зрнаца експерименталних животиња тако што спречава оксидативно оштећење изазвано слободним радикалима. Резултати *Sefi* и сарадника (2011) такође указују на могућу терапеутску примену кичице у смањењу оксидативног стреса и оштећења β -ћелија панкреаса код експерименталних животиња. Ефекат екстраката кичице у снижавању хипергликемије у крви показали су *Stefkov* и сарадници (2014) који овај ефекат приписују секундарним метаболитима кичице - флавоноидима, иридоидима и ксантонима. Антихипергликемијски ефекат показан је и у раду *Mansar-Benhamza* и сарадника (2013), уз напомену да је ефекат ових екстраката дозно зависан и да може довести до нежељених последица при дуготрајној употреби. Алкохолни екстракти кичице показују гастропротективни ефекат на индукованом акутном желудачном чиру (*Tuluce* и сар., 2011). Антипиретичну и антиинфламаторну активност водених екстраката кичице потврдили су *Berkan* и сарадници (1991). *Mroueh* и сарадници (2004) су доказали да орална примена екстраката кичице смањује количину ензима глутамат пируват трансминазе, глутамат оксалоацетат трансминазе и лактат дехидрогеназе у серуму експерименталних животиња и тиме указали на потенцијалну примену кичице у третману детоксикације јетре.

Широки спектар позитивних фармаколошких ефеката кичице приписује се синергистичком дејству биоактивних специјализованих метаболита из групе терпена и фенолних једињења. Међутим, услед неконтролисаног брања величине природних популација кичице се смањују, па се ова биљна врста налази на листама угрожених врста многих земаља. Из тог разлога се бројна истраживања фокусирају на алтернативне методе узгајања ове биљне врсте и одрживу производњу фармаколошки активних специјализованих метаболита из обновљивих извора.

2. ЦИЉЕВИ РАДА

Главни научни циљеви докторске дисертације су:

1. Испитивање промена у метаболичком путу секоиридоидних глукозида током одговора кичице (*Centaurium erythraea* Rafn) на стрес изазван механичким повређивањем листова, са посебним освртом на улогу биосинтетских гена и β -глукозидаза.
2. Изолација и функционална карактеризација гена кичице за ензим β -глукозидазу који показује високу специфичност ка секоиридоидним глукозидима као супстрату.
3. Испитивање ефекта хидролизе секоиридоидних глукозида и екстраката кичице у *in vitro* ензимским тестовима и у *in vivo* модел-системима (*Penicillium funiculosum*) на њихов антиоксидативни и антимикуробни потенцијал.

Реализација циљева обухватала је наведене кораке:

- Развијање аналитичких метода за идентификацију и квантификацију секоиридоидних глукозида кичице и њихових агликона.
- Фитохемијску карактеризацију метанолних екстраката кичице и секоиридоида пре и након ензиматске хидролизе комерцијалном β -глукозидазом.
- Испитивање антиоксидативног и антимикуробног дејства метанолних екстраката кичице и стандардних једињења секоиридоида пре и након ензиматске хидролизе β -глукозидазом.
- Испитивање трансформације екстраката *C. erythraea* у *in vivo* условима посредством гљиве *Penicillium funiculosum*.
- Испитивање утицаја механичке повреде и примене метил јасмоната на продукцију секоиридоидних глукозида и експресију гена укључених у метаболички пут секоиридоида у листовима кичице.
- Испитивање промене експресије гена за одабране транскрипционе факторе и њиховог значаја у регулацији биосинтетског пута секоиридоида код кичице.
- Функционална карактеризација β -глукозидаза кичице хетерологом експресијом у организму домаћину (*Escherichia coli*) и испитивањем хидролитичке активности рекомбинантних протеина у *in vitro* ензиматским тестовима.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Фитохемијске анализе екстраката листова кичице и секоиридоидних глукозида

3.1.1. Успостављање *in vitro* културе врсте *Centaureum erythraea* Rafn

Семена *C. erythraea* (кичица) сакупљена су током 2014. године на локалитету Беочин (Србија, географска дужина: 45°10'34.20"N; географска ширина: 19°43'16.58"E), и депонована у колекцији семена Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду, на - 20 °C до употребе. Семена су површински стерилисана 20% раствором варикине током 10 минута, испрана пет пута стерилном дејонизованом водом и пребачена у Петри кутије са стерилисаном ½ MS хранљивом подлогом (*Murashige* и *Skoog*, 1962), са додатком 20 g l⁻¹ сахарозе и 7 g l⁻¹ агара. Вредност pH хранљиве подлоге подешена је на 5,8 пре стерилизације. Стерилисана семена кичице су исклијавана у условима дугог дана (16/8 h режима светло/мрак) на температури од 25 ± 2 °C (Слика 13а). Клијанци су у стерилним условима пребачени у стаклене тегле запремине 350 ml са провидним поликарбонатним затварачима и у истим условима гајене током три месеца.

3.1.2. Припрема узорка

3.1.2.1. Припрема метанолних екстраката листова кичице

Свежи листови кичице гајене у култури *in vitro* су уситњени до праха у течном азоту и екстраховани у метанолу (w/v=1:10) преко ноћи на 4 °C. Следећег дана смеша је кратко промешана, а затим додатно екстрахована помоћу ултразвука током 10 минута. Овако припремљени узорци су центрифугирани на 8000 g у трајању од 10 минута на 4 °C, филтрирани кроз целулозне филтере (величина пора 0,2 μm) и чувани на - 20 °C до тренутка употребе.

3.1.2.2. Хидролиза екстраката кичице и секоиридоидних глукозида

Реакција хидролизе екстраката кичице и секоиридоидник глукозида је вршена у условима *in vitro* и *in vivo*.

3.1.2.2.1. *In vitro* ензиматска реакција хидролизе метанолних екстраката кичице

Око 100 mg свежих листова биљака старих три месеца уситњено је у течном азоту и растворено у 1 ml 99,8% метанола (*AppliChem, Cheshire*, САД). Након ултразвучне екстракције биљног материјала (*RK100, Bandelin, Berlin*, Немачка) у трајању од 10 минута на собној температури, узорци су центрифугирани 10 минута на 10000 g. Добијени супернатанти су затим профилирани кроз целулозне филтере са величином пора 0,2 μm (*Agilent Technologies, Santa Clara*, САД). Метанол је уклоњен упаравањем под вакуумом на 30 – 45 °C (*Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg*, Немачка), након чега је 6 mg сувог остатка растворено у 8 ml 0,5 M цитрат-фосфатног пуфера (pH 5,5) или у истој запремини пуфера са

додатком $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ комерцијалне β -глюкозидазе изоловане из бадема (*SigmaAldrich*, CAS 9001-22-3, Немачка). Реакциона смеша је затим инкубирана на $35 \text{ }^\circ\text{C}$ током 16 сати и накнадно лиофилизована.

Леофилизовани узорци ензиматски хидролизованых метанолних екстраката кичице (ХМЕ) и метанолних екстраката кичице који нису хидролизованых (МЕ) су растворени у 2 ml 99,8% метанола. Након третмана ултразвуком у трајању од 15 минута (RK100, *Bandelin*, *Berlin*, Немачка) на собној температури, узорци су центрифугирани на 10000 g током 10 минута. Супернатанти су затим профилирани кроз целулозне филтере (величина пора $0,2 \text{ }\mu\text{m}$) и чувани на $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ до употребе.

3.1.2.2.2. *In vitro* ензиматска реакција хидролизе секоиридоидних глюкозида

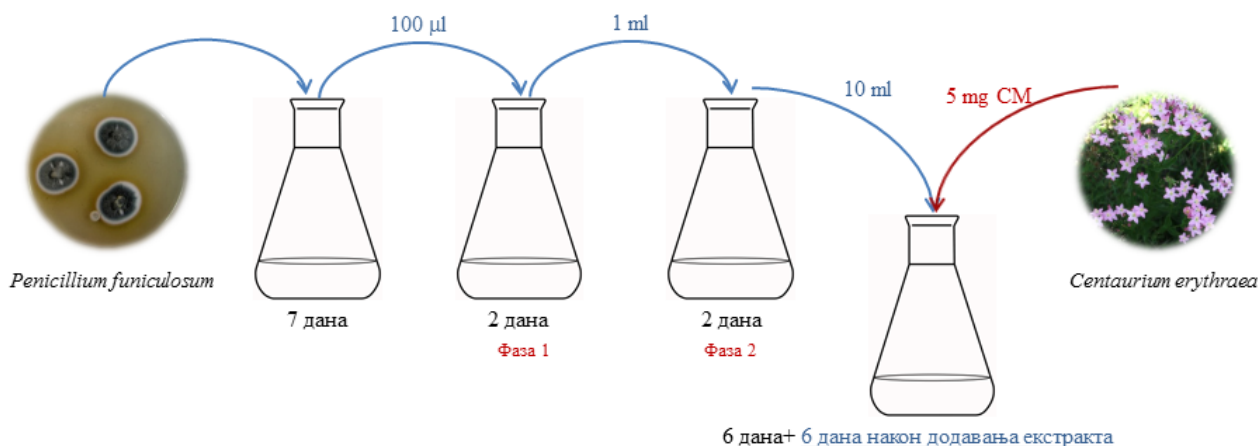
Комерцијални стандарди СВ, СВМ и ГП ($1,5 \text{ mg}$) су растворени у 1 ml $0,5 \text{ M}$ цитрат-фосфатног пуфера ($\text{pH } 5,5$) или у истој запремини пуфера са $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ комерцијалне β -глюкозидазе изоловане из бадема. Реакциона смеша је након инкубације на $35 \text{ }^\circ\text{C}$ током 16 сати лиофилизована, а затим је суви остатак растворен у 3 ml 99,8% метанола. Након ултразвучне екстракције у трајању од 10 минута на собној температури и центрифугирања на 10000 g током 10 минута, супернатанти су профилирани кроз целулозне филтере (величина пора $0,2 \text{ }\mu\text{m}$) и чувани до употребе на $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.2.2.3. *In vivo* биотрансформација метанолног екстракта кичице

Узорци су припремљени од надземних делова биљака сакупљених током 2011. године на планини Златибор (Србија, географска дужина: $43^{\circ}40'06.99''\text{N}$; географска ширина: $19^{\circ}38'46.34''\text{E}$) које су затим осушене на собној температури. Након уситњавања у течном азоту узорци су екстраховани преко ноћи у 99,8% метанолу ($w:v=1:5$). Следећег дана, након ултразвучне екстракције у трајању од 10 минута, екстракти су профилирани, а запремина подешена на 100 ml . Пре *UHPLC-MS/MS* квантификације једињења узорци су филтрирани кроз целулозне филтере (величина пора $0,2 \text{ }\mu\text{m}$) и чувани на $4 \text{ }^\circ\text{C}$ до употребе. За експеримент биотрансформације екстракти су упарени под вакуумом до сува (СЕ) на $30 \text{ }^\circ\text{C}$ - $45 \text{ }^\circ\text{C}$ и растворени у 5% *DMSO* до финалне концентрације од 5 mg сувог екстракта по ml DMSO ($5 \text{ mg SE ml}^{-1} \text{ DMSO}$).

Сој *Penicillium funiculosum* ATCC 36839 је гајен током 7 дана на кромпир декстрозно агарозном медијуму (енг. *PDB - Potato Dextrose Brot -*) (Табела 18) на $26 \text{ }^\circ\text{C}$ (Слика 12). Након тога $100 \text{ }\mu\text{l}$ културе је пренето на 50 ml свежег *PDB* медијума и инкубирано 2 дана на хоризонталној ротационој мешалици (100 обртаја у минути) на собној температури (фаза 1). У наредном кораку је 50 ml течног медијума инокулирано са 1 ml културе и инкубирано током наредна два дана на собној температури до почетка експеримента биотрансформације (*Zeng и сар.*, 2014).

Биотрансформација је започета инокулацијом 10 ml претходно описане течне културе *P. funiculosum* (фаза 2) у 90 ml PDB медијума. Након инкубације у трајању од 6 дана на ротационој мешалици на температури од $28 \text{ }^\circ\text{C}$, у течну културу додат је 1 ml екстракта *S. erythraea* и током наредних 6 дана култура је гајена на $26 \text{ }^\circ\text{C}$. Сублетална концентрација додатог екстракта *S. erythraea* је одређена на основу микродилуционог антимицробног теста и износила је 5 mg суве масе по ml DMSO (Слика 12).



Слика 12. Схематски приказ тока експеримента *in vivo* биотрансформације метанолног екстракта кичице

Способност *P. funiculosum* да трансформише секоиридоидне глукозиде је утврђена на основу промена у садржају секоиридоида у течној култури. Узорци течног медијума су узорковани на свака три дана и растварани у ацетонитрилу ($v:v=1:1$). Након центрифугирања на 8000 g у трајању од 15 минута на собној температури супернатанти су профилирани кроз целулозне филтере (величина пора $0,2\ \mu\text{m}$) и анализирани према описаној аналитичкој методи (Поглавље 3.1.4).

3.1.3. UHPLC/Orbitrap-MS/MS квалитативна анализа

Раздвајање и идентификација компоненти од интереса вршена је на систему за течну хроматографију под ултра високом притиском (UHPLC) са кватернарном Accela 600 пумпом и Accela аутосемплером који је био повезан са хибридном масеним спектрометром високе резолуције (LTQ Orbitrap XL) са јонским извором у облику електроспреј јонизације (енг. ESI - ElectroSpray Ionization). Хроматографско раздвајање компоненти метанолног екстракта вршено је на Synchronis C18 колони ($100 \times 2,1\ \text{mm}$) са величином честица $1,7\ \mu\text{m}$. Проток је био подешен на $0,300\ \text{ml min}^{-1}$, док се мобилна фаза састојала од (А) ултрачисте воде са 0,1% сирћетне киселине и (Б) ацетонитрила (MS чистоће). Ињекциона запремина је била $5\ \mu\text{l}$, а линеарно градијентни програм мобилне фазе је описан раније у литератури (Banjanac и сар., 2017).

Снимање масених спектра је вршено у негативном јонизационом режиму. Параметри јонског извора били су исти као у раду Banjanac и сарадника (2017). Јони од интереса су изоловани у „јонској замци“ са тачношћу од 3 ppm и активирани са 35% колизионе енергије. Full scan анализа коришћена је за откривање моноизотопске масе непознатих једињења, док је пут фрагментације добијен MS⁴ фрагментацијом потврђен и коришћењем Mass Frontier 6.0 софтвера (ThermoFisher Scientific, Немачка). Програм за цртање хемијских формула ChemDraw (верзија 12.0) коришћен је за израчунавање тачних маса једињења. Свако једињење је идентификовано помоћу одговарајућих спектралних карактеристика: масени спектар, тачна маса, карактеристична фрагментација и ретенционо време. Xcalibur софтвер (верзија 2.1) коришћен је за контролу инструмента, прикупљање и анализу података. Стандарди фенолних једињења су набављени од фирме Sigma Aldrich (Steinheim, Немачка).

3.1.4. UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS квантитативна анализа секоиридоида

Квантификација циљаних секоиридоида у узорцима је извршена коришћењем *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* система (*Thermo Fisher Scientific*, Немачка) опремљеног ултраљубичастим детектором са више диода (*DAD*) који је био конфигуриран са масеним спектрометром који поседује детектор са три анализатора - троструки квадрупол (*UHPLC-qqqMS*, *TSQ Quantum Access Max*, *ThermoFisher Scientific*, Швајцарска). За хроматографско раздвајање коришћена је *Hypersil gold C18* колона ($50 \times 2,1 \text{ mm}$) са величином честица од $1,9 \mu\text{m}$ (*Thermo Fisher Scientific*, САД), термостатирана на $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Брзина протока мобилне фазе, која се састојала од 0.1% мравље киселине у води (А) и ацетонитрила *MS* чистоће (Б) била је подешен на $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. Елуирање једињења било је у реверзно-фазном режиму са градијентним програмом мобилне фазе описаним у литератури (*Mišić* и сар., 2015). Ињекциона запремина била је $10 \mu\text{l}$. *DAD* спектри су снимани на $\lambda=260$ и 320 nm .

Температура јонске пробе масенег спектрометра, опремљеног јонским извором у облику електроспреј јонизације, била је подешена на $450 \text{ }^\circ\text{C}$, а температура капиларе на $320 \text{ }^\circ\text{C}$. Волтаже спреја и сочива биле су 4 и 0 *kV*, а притисци носећег гаса, гаса у јонском извору и ауксиларног гаса (N_2) 50, 0 и 20 *AU*, наведеним редом. Масени спектри снимани су у позитивном и негативном режиму, док је за фрагментацију коришћен аргон као колизиони гас. Колизиона енергија (*cE*) била је 10 *eV* и за секоиридоидне глукозиде и за њихове агликоне. *SRM* метода (енг. *SRM - the selected reaction monitoring*) коришћена је за квантификацију циљаних једињења у узорцима.

Идентификација секоиридоидних глукозида и њихових агликона у биљним екстрактима изведена је упоређивањем њихових *MS*, *MS*², *UV* спектра и ретенционих времена са аутентичним стандардима, као и претраживањем литературе. Основни стандардни раствори су припремљени растварањем 1 *mg* ЛК (*Extrasynthese*, *Genay*, Француска), ЛОГ и СЛОГ (*Sigma-Aldrich*, *Darmstadt*, Немачка), СВ и СВМ (оба 98% чистоће, *Oskar Tropitzsch*, *Marktrechwitz*, Немачка) и ГП (>90% чистоће, *Carl Roth*, *Karlsruhe*, Немачка) у 1 *ml* метанола. Радне стандардне смеше су припремљене растварањем основног раствора чистих једињења да би се добила концентрација од $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, док су други нивои калибрације добијени разблаживањем раствора метанолом. Радни стандардни раствори су припремљени на 15 калибрационих нивоа у распону концентрација од $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ до $0,001 \mu\text{g ml}^{-1}$. Одређене су граница детекције (ГД), граница квантификације (ГК), линеарност, поновљивост и осетљивост развијене *UHPLC-qqqMS* методе. Вредности ГД и ГК су одређене на основу односа сигнала и шума (С/Ш), са $\text{C/Ш} > 3$ за ГД и >10 за ГК. За израчунавање ГД и ГК рађено је шест анализа за сваки калибрациони ниво. Регресија је израчуната за сваку од калибрационих крива и све су показале одговарајућу линеарност са коефицијентима корелације између $r=0,990$ и $0,999$, $p < 0,001$. Укупна количина сваког циљаног једињења у узорцима одређена је израчунавањем интеграла површине пика и изражена је као mg g^{-1} или $\mu\text{g g}^{-1}$ суве материје (СМ).

3.1.5. Одређивање антиоксидативне активности

Антиоксидативна активност хидролизованых метанолних (ХМЕ) и нехидролизованых екстраката (МЕ) надземног дела кичице одређивана је применом три различите *in vitro* методе: 1) неутрализација *DPPH* радикала, 2) неутрализација *ABTS* радикала и 3) одређивање редукционе способности јона гвожђа. Поред антиоксидативног потенцијала екстраката, испитана је и активност хидролизованых и нехидролизованых стандардних једињења: СВ, СВМ и ГП. За спектрофотометријска мерења коришћен је *Agilent 8453 UV-VIS* спектрофотометар (*Agilent Technologies*, *Waldbronn*, Немачка).

3.1.5.1. Способност неутрализиције DPPH радикала

DPPH метода се заснива на способности антиоксиданаса да редукују стабилан радикал 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH•) са максималном апсорпцијом на 517 nm и да га том приликом обезбоји. Тест је спроведен по методи коју су описали Brand-Williams и сарадници (1995) са мањим изменама. Реакциона смеша се састојала од 500 μ l 200 μ M дифенил-2-пикрилхидразила (DPPH•) раствореног у метанолу, 50 μ l тестираног узорка и 450 μ l метанола. Након инкубације у трајању од 30 минута на собној температури мерена је апсорбанца раствора на 517 nm, а резултати су представљени као еквивалент антиоксидативног капацитета галне киселине (Sigma Aldrich, Немачка) (mmol GAE) на 100 mg свежје масе биљке. Сва мерења су поновљена три пута.

3.1.5.2. Способност неутрализиције ABTS радикала

Испитивање антиоксидативних својстава различитих једињења ABTS⁺ радикал катјонском методом се заснива на конверзији ABTS (2,2-азинобис 3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине) у радикалски катјон у присуству натријум персулфата (Na₂S₂O₈). Настали катјон апсорбује светлост на 734 nm, а након додавања антиоксиданса катјон се неутралише и губи боју, што се може спектрофотометријски квантификовати. ABTS тест је урађен по методи коју су описали Re и сарадници (1999). Раствор ABTS⁺ је добијен мешањем истих запремина 7 mM ABTS и 2,45 mM калијум персулфата и инкубацијом током 12 сати у мраку, на собној температури. ABTS⁺ је затим растворен у 80% етанолу док није постигнута апсорбанца од 0,7 ± 0,02 на λ =734 nm. Реакциона смеша, која се састојала од 30 μ l МЕ или ХМЕ узорка и 970 μ l ABTS радног раствора, инкубирана је на собној температури током 10 минута, након чега је измерена апсорбанца смеше на 734 nm.

ABTS⁺ активност се израчунава према формули:

$$\left[\frac{A_{734\text{узорак}} - A_{734\text{контрола}}}{A_{734\text{контрола}}} \right] * 100$$

где је $A_{734\text{узорак}}$ апсорбанца раствора који садржи узорак или стандардно једињење, а $A_{734\text{контрола}}$ апсорбанца контролног раствора без узорка или стандардног једињења.

За конструкцију калибрационе криве коришћен је метанолни екстракт галне киселине, а резултати су представљени као еквивалент антиоксидативног капацитета галне киселине (Sigma Aldrich, Немачка) (mmol GAE) на 100 mg свежје масе биљке. Резултат представља средњу вредност три независна мерења.

3.1.5.3. Редуктивна активност (FRAP метода)

FRAP метода се заснива на способности антиоксиданаса да донирањем електрона у киселој средини (pH 3,6) редукују жути комплекс гвожђа (Fe³⁺) са 2,4,6-три (2-пиридил)-1,3,5-триазином (TPTZ) у плаво обојени комплекс Fe²⁺-TPTZ, при чему се интензитет настале плаве боје мери спектрофотометријски на λ =593 nm.

FRAP тест је урађен по методи коју су описали Benzie и Strain (1996) уз мање измене. Реакциона смеша се састојала од 300 mM натријум ацетатног пуфера (pH 3,6), 20 mM раствора гвожђе хлорида (FeCl₃) и 10 mM гвожђе-2,4,6-три(2-пиридил)-1,3,5-триазина (Fe³⁺-TPTZ) раствореног у 40 mM HCl у размери 10:1:1. У 950 μ l реакционе смеше додавано је 50 μ l узорка, а затим је, након 10 минута инкубације на собној температури, измерена апсорбанца смеше на 593 nm. Резултати су представљени као редукујућа активност еквивалента галне

киселине (*Sigma Aldrich*, Немачка) (*mmol GAE*) на 100 *mg* свеже масе надземног дела биљке. Сва мерења су поновљена три пута.

3.1.6. Испитивање антимикуробне активности

3.1.6.1. Врсте микроорганизама

У раду је коришћено осам бактеријских врста и осам врста гљива депонованих у лабораторији за микологију Одељења за биљну физиологију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду. Тестиране су четири Грам-позитивне бактерије: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* (клинички изолат), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973) и *Micrococcus flavus* (ATCC 10240) и четири Грам-негативне бактерије: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) и *Enterobacter cloacae* (људски изолат). Поред тога, коришћено је и осам врста микрогљива: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 9197), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Trichoderma viride* (IAM 5061), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium ochrochloron* (ATCC 9112) и *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (изолат из хране). Бактерије су гајене током 24 сата на 37 °C, на *Mueller Hinton agar* (МНА) медијуму, а микрогљиве на хранљивој подлози *Malt agar* (МА) током 21 дана на 25 °C. Састав коришћених хранљивих подлога за гајење микроорганизама приказан је у Табели 18.

3.1.6.2. Микродилуциона метода

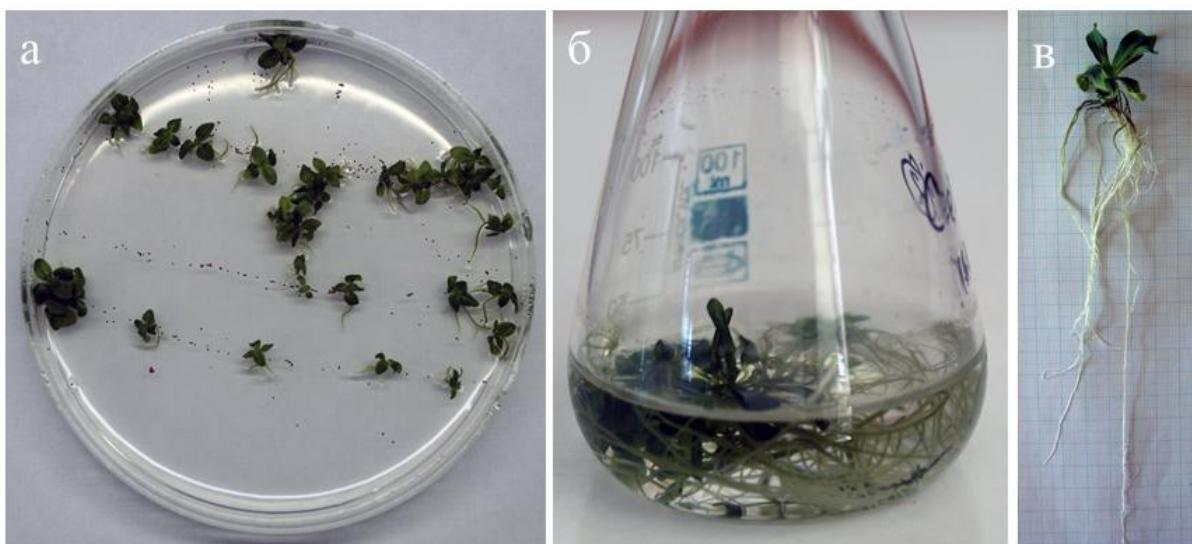
За испитивање антимикуробне активности МЕ и ХМЕ, као и секоиродоидних гликозида и њихових хидролизованых облика, лиофилизати добијени по процедури описаној у поглављу 3 су растворени у 5% диметил сулфоксиду (*DMSO*). Анализа антимикуробне активности МЕ и ХМЕ кичице, као и секоиродоидних гликозида и њихових хидролизованых облика урађена је коришћењем микродилуционе методе (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2009; *Tsukatani* и сар., 2012). Концентрација бактеријских суспензија подешена је додавањем физиолошког раствора до финалне концентрације $1,0 \times 10^{-5}$ *CFU* (енг. *CFU - colony – forming unit*) *ml*⁻¹. Инокулум је припреман свакодневно и чуван до употребе на температури од 4 °C. Минимална инхибиторна концентрација (енг. *MIC - minimal inhibitory concentration*) и минимална бактерицидна концентрација (енг. *MBC - minimal bactericidal concentration*) одређена је у микротитрационим плочама са равним дном и 96 бунарића, од којих је сваки садржао 200 μ l финалне запремине инкубационог медијума. Инкубациона смеша је садржала *TSB* медијум (енг. *TSB - triptic soy broth* – Табела 18), екстракт кичице или стандардног једињења у серији разблажења (од 60 μ g *ml*⁻¹ до 1 μ g *ml*⁻¹), као и 10 μ l бактеријске суспензије. Након додавања бактеријског инокулума плоче су инкубирани на хоризонталној ротационој мешалици (160 обртаја у минути) током 24 *h*, на 37 °C. *MIC* је одређена употребом *p* - јодонитротетразолијум боје и поређењем са негативном контролом за сваки бактеријски сој. Најнижа концентрација која инхибира раст бактерија у поређењу са контролним бунарићем, који није садржао тестирано једињење или екстракт (праћено под бинокуларном лупом), дефинисана је као *MIC* вредност. *MBC* вредност је одређена након реинокулације 2 μ l садржаја из бунарића микротитрационе плоче у којем није забележен раст бактерије у 100 μ l медијума и поновне инкубације током 24 *h* на 37 °C. Као позитивна контрола коришћени су комерцијални антибиотици стрептомицин (*Sigma-Aldrich*, Немачка) и ампицилин (*Sigma-Aldrich*, Немачка).

Антифунгална активност узорака одређена је методом коју је описао *Espinel-Ingroff* (2001). Концентрација спора у течной подлози је подешена на $10^5 ml^{-1}$, а узорци су тестирани у серији различитих разблажења. Течна хранљива подлога инокулисана микрогљивама је разливена у микротитрационе плоче које су затим инкубиране током 72 сата на температури од 28 °C. Минималне инхибиторне и минималне фунгицидне концентрације (енг. *MFC - minimal fungicidal concentrations*) одређиване су реинокулисањем 2 μl инокулума у 100 μl течног хранљивог медијума, након чега су културе инкубиране наредна 72 сата на 26 °C. Концентрације тестираних узорака на којима није забележен раст гљива означене су као *MFC*. Комерцијални антимиотици кетоназол (*Zorka Pharma*, Србија) и бифоназол (Срболек, Србија) коришћени су као позитивна контрола.

3.2. Механичко повређивање биљака и третман метил јасмонатом

3.2.1. Селекција и умножавање одабраног генотипа

Семена *C. erythraea* (кичица) сакупљена су током 2010. године на локалитету Паља (Србија, географска ширина: $45^{\circ}43'37.64''N$; географска дужина: $22^{\circ}27'14.07''E$), исклијавана и гајена у култури *in vitro* на начин описан у Поглављу 3.3.1.



Слика 13. *In vitro* култура *C. erythraea* а) изглед клијанаца, б) течна култура коренова, в) изглед биљке након три месеца гајења у култури *in vitro*.

Након три месеца култивације кичице у култури *in vitro* анализиран је садржај секоиридоидних глукозида у 10 насумично одабраних јединки (генотипова) из популације пореклом из Паље (П1-П10). Генотип са највећим садржајем секоиридоидних глукозида (П1), означен као високопродуктивни генотип, даље је умножаван методом течне *in vitro* културе коренова. Врхови коренова са апикалним меристемом, дужине 10 mm, су пребачени у ерленмајере са 50 ml течне $\frac{1}{2}$ MS хранљиве подлоге и гајени на ротационој мешалици при брзини од 95 обртаја у минути. Након месец дана гајења експлантата уочено је спонтано формирање пупољака (Слика 13 б), који су затим пребачени у тегле запремине 370 ml са 70 ml чврсте $\frac{1}{2}$ MS хранљиве подлоге. Након три месеца гајења у условима дугог дана (16/8 h

режима светло/мрак), на температури од 25 ± 2 °C, овако добијене биљке (Слика 13 в) су коришћене у експериментима.

3.2.3. Механичко повређивање биљака

Механичко повређивање експерименталних биљака вршено је на просечно 5 листова по биљци. Коришћењем стерилних маказа прављени су мали резови (око 0,5 cm) дуж листова, паралелно са простирањем лисног нерва. Повређени (ПЛ) и интактни, цели листови (ЦЛ) са по три биљке су сакупљани након 2, 4, 8, 16, 24, 48 и 96 h за свако од три биолошка понављања, замрзнути у течном азоту и чувани до употребе на - 80 °C. Листови неповређених биљака су коришћени као контрола. Узорковање листова вршено је увек у истој фази развића.

3.2.4. Третман биљака метил јасмонатом

Раствор метил јасмоната (*Sigma Aldrich*, Немачка), у финалној концентрацији 250 μ M, је додаван филтер стерилизацијом у претходно стерилисан $\frac{1}{2}$ MS медијум. Биљке кичице које су током три месеца гајене на $\frac{1}{2}$ MS хранљивој подлози су, у асептичним условима, преносене на $\frac{1}{2}$ MS хранљиву подлогу са додатим метил јасмонатом (*MeJA*) и гајене у условима дугог дана (16/8 h режима светло/мрак). Нетретирани биљке су гајене под истим условима, на $\frac{1}{2}$ MS хранљивој подлози без додатка *MeJA*. Надземни делови третираних и нетретираних биљака су сакупљени након 1 h и 48 h, замрзнути у течном азоту и до употребе чувани на температури од - 80 °C.

3.2.5. *UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS* квантитативна анализа секоиридоида

У експериментима повређивања листова кичице, као и за потврду функције β -глукозидаза, идентификација и квантификација иридоида и секоиридоида у узорцима урађена је на већ описаном масеном спектрометру (Одељак 3.1.4) уз следеће модификације параметара: температура јонске пробе 300 °C, температура капиларе 320 °C, притисак носећег гаса 28 AU, притисак ауксиларног гаса (N_2) 10 AU. Фрагментација је изазвана помоћу аргона као колизионог гаса, а колизиона енергија је подешена на 20 eV за сва анализирана једињења. Иридоиди ЛК и ЛОГ, као и секоиридоиди СЛОГ, СВ, СВМ и ГП су квантификовани у *SRM* режиму масеног спектрометра. Хроматографско раздвајање је урађено коришћењем 0.01% сирћетне киселине и ацетонитрила као мобилне фазе.

3.2.6. Анализа експресије гена

3.2.6.1. Изолација РНК из листова кичице

За изолацију рибонуклеинске киселине (РНК) из листова кичице коришћен је модификовани протокол који су описали *Gašić* и сарадници (2004). Процес изолације укупне РНК из биљног материјала изведен је у стерилним условима. Вода коришћена за припрему раствора за изолацију третирана је инхибитором рибонуклеаза - диетилпирокарбонатом (*DEPC*) током 6 сати, након чега је стерилисана 25 минута на 124 °C. Сви раствори (осим раствора који садрже алкохол), авани и тучкови су пре коришћења такође стерилисани.

Око 150 mg биљног ткива је хомогенизовано у авану уз додатак течног азота. У узорке је додато 650 μ l екстракционог пуфера (100 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM Na-EDTA, 2 M NaCl, 0,5 g l⁻¹ спермидин, 2% (w/v) поливинилпирилоидон, 2% (w/v) етилтриметиламонијум-бромид) и 15 μ l β -меркаптоетанола. Након хомогенизације узорци су инкубирани 15 минута у воденом купатилу на 60 °C. У сваки узорак је додато по 650 μ l смеше хлороформ:изоамил алкохол у односу 24:1 (v:v), након чега су узорци центрифугирани 10 минута на 10000 g на температури од 4 °C. Екстракција смешом хлороформа и изоамил алкохола је поновљена још једном. У супернатант (око 600 μ l) је додато 166 μ l 7,5 M литијум хлорида, а узорци су потом инкубирани на 4 °C преко ноћи. Наредног дана, узорци су центрифугирани 45 минута на 12000 g на 4 °C. Супернатант је одстрањен, а остатак испран са 1 ml 70% етанола и након тога центрифугиран на 12000 g током 10 минута, при температури од 4 °C. Супернатант је одстрањен, а остатак осушен током 10 минута у ламинарној комори. Након сушења остатак је растворен у 100 μ l стерилне воде, а затим је смеси додато 10 μ l 3 M натријум ацетата (pH 5,5) и 275 μ l 70% етанола. Узорци су промешани инвертовањем, инкубирани 2 сата на 80 °C, а потом центрифугирани на 12000 g током 45 минута на 4 °C. Супернатант је одстрањен, остатак испран са 1 ml 70% етанола и поново центрифугиран током 10 минута на 12000 g на 4 °C. Супернатант је одстрањен, а остатак осушен у ламинарној комори и растворен у 50 μ l стерилне воде. Концентрација изоловане РНК одређена је спектрофотометријски (N60 Nano-Photometer®, Implen GmbH, Немачка), а квалитет изолације проверен је на агарозном гелу.

3.2.6.2. Електрофореза на агарозном гелу

За проверу квалитета РНК коришћена је хоризонтална електрофореза на агарозним геловима, концентрације 0,8 - 1,2 %, са додатком етидијум бромида (0,5 μ g ml⁻¹) у TBE пуферу (89 mM Tris, 89 mM борна киселина, 2 mM EDTA). У узорке је, пре nanoшења на гел, додавана боја (6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific, САД). За електрофорезу су коришћена два система: BlueMarine™ 200 и BlueMarine™ 100 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Немачка), са извором напајања Standard Power Pack P25, Biometra®, (Goettingen, Немачка). Системи су пре електрофорезе третирани раствором водоник пероксида (3%) током 60 минута. Детекција РНК је извршена на апарату ST4 3026-WL/26M (Vilber Lourmat, Torcy, Француска).

3.2.6.3. Третман дезоксирибонуклеазом

Иzolована РНК је третирана дезоксирибонуклеазом 1 (DNase I, Thermo Scientific, Waltham, САД) да би се елиминисали остаци геномске ДНК. Састав реакционе смеше је приказан у Табели 1.

Табела 1. Састав реакционе смеше за третман дезоксирибонуклеазом

Компонента	По реакцији (10 μ l)
10 x реакциони пуфер	1 μ l
DNase I (1 U μ l ⁻¹)	1 μ l
РНК (1 μ g)	
DEPC H ₂ O	

Третман РНК је трајао 30 минута на 37 °C, а реакција је заустављана додавањем 1 μ l 50 mM EDTA (Thermo Scientific, Waltham, САД) и накнадном инкубацијом на 65 °C током 10 минута. Овако третирана РНК је даље коришћена у реакцији реверзне транскрипције.

3.2.6.4. Реверзна транскрипција

Синтеза комплементарне једноланчане ДНК (енг. *cDNA*) изведена је коришћењем *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* комплета (*Thermo Scientific, Waltham, САД*), по упутству произвођача. Састав реакционе смеше дат је у Табели 2. Узорци су инкубирани 60 минута на 42 °C, а реакција је заустављена инкубацијом на 70 °C у трајању од 5 минута.

Табела 2. Састав реакционе смеше за реверзну транскрипцију

Компонента	По реакцији (30 μ l)
РНК (0,1 μ g μ l ⁻¹)	3 μ l
олиго (<i>dT</i>) прајмер	1 μ l
5x реакциони пуфер	6 μ l
<i>RiboLock</i> [™] (20 U μ l ⁻¹)	1,5 μ l
10 mM <i>dNTP</i>	3 μ l
реверзна транскриптаза (<i>RevertAid</i> [™] , <i>M-MuLV</i> (20 U μ l ⁻¹))	1,5 μ l
<i>DEPC H₂O</i>	14 μ l

3.2.6.5. Квантитативни PCR

Анализом транскриптома листа кичице (*Malkov и Simonović, 2011*) помоћу софтвера *BioEdit* (v7.0.5.3) (*Hall, 1999*) издвојене су нуклеотидне секвенце гена биосинтетског пута секоиродоида (*CeGPPS, CeGES, CeG8O, Ce8HGO, CeIS1, CeIS2, CeIO, Ce7DLGT, Ce7DLH2, CeLAMT, CeSLS*), гена одабраних транскрипционих фактора (*CeCOII, CeJAZ, CeBIS1, CeMYC2, CeJAM2, CeJAM3*), гена за β -глюкозидазу (*CeBGLU*), као и гена за елонгациони фактор 1 алфа (*EF1 α* , у даљем тексту *CeEF1*) који је коришћен као референтни ген (енг. *house keeping gene*). На основу издвојених секвенци коришћењем *on line* сервиса *Primer-BLAST* и сервиса *Primer3Plus* конструисани су прајмери који су у даљем раду коришћени за анализу експресије гена (секвенце прајмера са дужином очекиваног ампликона дате су у Табели 3).

За проверу специфичности прајмера (Табела 3) који су коришћени за квантитативни PCR (енг. *polymerase chain reaction*) употребљена је *Q5 Hot Start High-Fidelity* ДНК полимеразе (*New England Biolabs, САД*). Састав реакционе смеше је приказан у Табели 4, а програм PCR амплификације у Табели 5.

Инкубације, реверзна транскрипција и PCR реакције су извођене у PCR апаратима модела *Eppendorf Mastercycler Gradient* (*Eppendorf, Wiena, Аустрија*) и *peqSTAR 96 Universal Gradient* (*Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Немачка*).

Табела 3. Прајмери коришћени у квантитативним *PCR* реакцијама

Назив прајмера	Секвенца прајмера (5'→3')	Дужина ампликона (<i>bp</i>)
<i>CeGPPS</i>	<u>CTTCGTGCTGTCATTCAAGCG</u> AAAGAATCGACCCGACGAGAGA	150
<i>CeGES</i>	<u>TGACAAAGCCCTTGGAAGCT</u> ACGCAACGAAGCAGTAAGGA	149
<i>CeG80</i>	<u>TCAGTTCCAAACGCACTCCA</u> TGTTGATTAGCGTCGAGCCG	150
<i>Ce8HGO</i>	<u>AAGGCGACATAGTGATGCCA</u> GACCATGTGGAGCAGCTGAA	184
<i>CeIS1</i>	<u>GAAAAACTCACCCGGCGTCAC</u> CCGATTATTAGCCCCACGCT	150
<i>CeIS2</i>	<u>CAAGCCATTGGTGTATCCAG</u> CACTTGATTCTTCGCCTTGG	125
<i>CeIO</i>	<u>ATCGAATGGGGATTTCGCGG</u> AGCAAAAGTGGGAGAGCTGG	182
<i>Ce7DLGT</i>	<u>GTCATGAGGCCCGATTTCGAT</u> AATCATAGGCACGCCACACA	204
<i>Ce7DLH2</i>	<u>ACGCAGGAAACTAATCGCCA</u> CACCTTTGCCTCCCATTTCG	109
<i>CeLAMT</i>	<u>TAAGGTAGAGGTCCCTGCC</u> TTTGACGAGCAATGACACC	150
<i>CeSLS</i>	<u>CCAAGCGACTCGAGAAGCG</u> TGACACGAGGGAAAAGGTCA	150
<i>CeBGLU</i>	<u>TTTCCGCCAGTACGTAGAGC</u> TGGGGAAGTAGACCCTCGAC	142
<i>CeCOI1</i>	<u>CATCAGGAAATGCACACGAT</u> GTGCCAGCCAGTGAATAGT	159
<i>CeJAZ</i>	<u>TTGCTGATTCCGGTAGGTT</u> TGAATTCCTCCACCTGACC	209
<i>CeBIS1</i>	<u>GCTTAATCTTACAGTTACAAGCAGAAA</u> CTACTTGAGTTGGGCGTTGG	156
<i>CeMYC2</i>	<u>CCGAAAAGCAAGACTTGAGG</u> TGGCTGCTGATGACTTGATG	123
<i>CeJAM2</i>	<u>ATGCAGGGACTTGTCATGG</u> AGCCCTCAACATCTGAATGC	161
<i>CeJAM3</i>	<u>TTCTCCGAAGGTGGAAGATG</u> GCTCCAAGGTAGAAATCATGG	165
<i>CeEF1</i>	<u>AGATGCACCATGAAGCCCTC</u> GATGACCTGGGAGGTGAAGC	158

Табела 4. Састав реакционе смеше за *PCR* амплификацију помоћу *Q5 Hot Start High-Fidelity* ДНК полимеразе

Компонента	По реакцији (25 μ l)
5XQ5 реакциони пуфер	5 μ l
10 mM смеша dNTP	0,5 μ l
10 μ M F (енг. <i>forward</i>) прајмер	1,25 μ l
10 μ M R (енг. <i>reverse</i>) прајмер	1,25 μ l
cDNA	1,5 μ l
<i>Q5 Hot Start High-Fidelity</i> ДНК полимеразе	0,25 μ l
стерилна дејонизована вода	14,75 μ l

Табела 5. Параметри програма за извођење *PCR* амплификације са *Q5 Hot Start High-Fidelity* ДНК полимеразом

Корак	T (°C)	време трајања	број циклуса
иницијална денатурација	98	30 секунди	1
денатурација	98	10 секунди	
везивање прајмера	*	30 секунди	35
екстензија	72	1 минут	
финална екстензија	72	2 минута	1

Квантитативни *PCR* (*qPCR*) коришћен је за одређивање нивоа експресије одабраних гена уз употребу комерцијалног комплета *Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix 2x* (*Thermo Scientific*, САД) и апарата *Light cycler QuantStudio 3* (*Thermo Fisher Scientific*, САД), према упутству произвођача. Реакционе смеше запремине 10 μ l су садржале по 1 μ l одговарајуће комплементарне ДНК добијене по претходно описаном протоколу од 300 ng укупне РНК растворене у води 1:10 (v:v), 5 μ l *SYBR Green* смеше, 0,4 μ l смеше парова прајмера (10 μ M) и 3,6 μ l воде. Услови амплификације су наведени у Табели 6. Прајмери коришћени у квантитативним *PCR* реакцијама дати су у Табели 3.

Табела 6. Параметри програма квантитативне *PCR* (*qPCR*) реакције

корак	T (°C)	време трајања	број циклуса
иницијална денатурација	95	10 минута	1
денатурација	95	15 секунди	
везивање прајмера	60	30 секунди	40
екстензија	72	30 секунди	
финална екстензија	72	10 минута	1

Ниво експресије испитиваних гена одређиван је према $2^{-\Delta\Delta C_t}$ методи (*Livak* и *Schmittgen*, 2001), где је као референтни ген коришћен *CeEF1* за који је потврђена конститутивна експресија у листовима независно од примењеног третмана.

3.3. Изолација и клонирање гена кандидата за ензим β -глюкозидазу кичице

Нуклеотидне секвенце гена кандидата за β -глюкозидазу издвојене су на основу поређења секвенце за стриктозидин- β -глюкозидазу врсте *Catharanthus roseus* (приступни број у *on line* бази података *NCBI* (енг. *National Center for Biotechnology Information*) дат је у Табели П2 прилога) са транскриптомом листова кичице (*Malkov* и *Simonović*, 2011) коришћењем софтвера *BioEdit* (v7.0.5.3) (*Hall*, 1999). Прајмери за изолацију пуне дужине гена конструисани су коришћењем софтверског пакета *Primer3Plus*.

3.3.1. Изолација и амплификација пуне дужине гена кандидата за β -глюкозидазу кичице

За изолацију и амплификацију пуне дужине гена кандидата за β -глюкозидазу коришћени су специфично конструисани прајмери (Табела 7) и *Q5 Hot Start High-Fidelity* ДНК полимеразе (*New England Biolabs*, САД).

Табела 7. Прајмери коришћени за *TA* клонирање и клонирање засновано на рестрикционим ензимима

Назив прајмера	Секвенца прајмера (5'→3')	T (°C)
<i>CeBGLU9712650_F</i>	GCTTAATCGGCTGAAATGGCA	61
<i>CeBGLU9712650_R</i>	TACATTAATTTGAAAATTCTGTTGCAG	
<i>CeBGLU_fl_XhoI_F</i>	GCATGACTCGAGATGGCAATTCTGAAAAGAAGTG	68
<i>CeBGLU_fl_KpnI_R</i>	GCATGAGGTACCTTAATTTGAAAATTCTGTTGCAGA	

Услови *PCR* амплификације наведени су у Табели 5, а састав реакционе смеше је приказан у Табели 4.

3.3.2. Пречишћавање из агарозног гела

Продукти амплификације су детектовани под *UV* светлом, а затим су траке са агарозног гела исечене стерилним скалпелом. За пречишћавање ампликона коришћен је *GeneJET Gel Extraction* комерцијални комплет за изолацију (*Thermo Scientific*, САД), по протоколу произвођача. Узорцима је додата иста запремина раствора *Binding Buffer* (100 mg гела ~ 100 μ l раствора). Агарозни гел је растворен у пуферу инкубацијом на 55 °C током 10 минута. Раствору је затим додат изопропанол у односу 1:1 (*v:v*), а смеша је пребачена у колону за пречишћавање и центрифугирана током једног минута на 12000 g. У колону је затим додато 700 μ l раствора *Wash Buffer*. Садржај на колони је испран помоћу 700 μ l раствора и центрифугиран. Након центрифугирања од једног минута течност је одбачена, а празне колоне још једном центрифугиране у циљу одстрањивања могућег заосталог раствора на колони. Колоне су пребачене у нове тубице и *PCR* продукт елуиран додавањем 50 μ l раствора *Elution Buffer*. Потом је колона центрифугирана током једног минута на 12000 g. Добијени производи су даље коришћени у процесу клонирања.

3.3.3. Клонирање

3.3.3.1. Спајање вектора и фрагмената ДНК

За *TA* клонирање *PCR* продукта коришћен је *InstAclone PCR Cloning Kit* (*Thermo Scientific*, САД), док је ДНК фрагмент циљаног гена у *pRSETA* вектор клониран коришћењем рестрикционих ензима. Спајање ДНК и *pTZ57R/T* или *pRSETA* вектора извршено је у

реакцији са ензимом *T4* ДНК лигазом (енг. *T4 DNA Ligase, Thermo Scientific, САД*) под условима наведеним у Табели 8.

Реакциона смеша је инкубирана током једног сата на собној температури током реакције лигације *CeBGLU* са *pTZ57R/T* вектором, док је лигациона реакција са *pRSETA* вектором инкубирана током 16 сати на 17 °C. Однос молекула *pRSETA* плаزمида према молекулу ДНК фрагмената подешен је на 1:6. Контролни узорак није садржао ДНК фрагмент циљаног гена.

Табела 8. Састав реакционе смеше за *TA* клонирање

Компонента	По реакцији (30 μ l)
вектор <i>pTZ57R/T /pRSETA</i>	3 μ l
5 x лигациони пуфер	6 μ l
<i>PCR</i> продукт/ДНК фрагмент	20 μ l
<i>T4</i> ДНК лигаза	1 μ l

3.3.3.2. *TA* клонирање

Након амплификације пуне дужине гена кандидата за β -глукозидазу помоћу *Q5 Hot Start High-Fidelity* ДНК полимеразе, настали фрагменти ДНК имали су равне крајеве (енг. *blunt ends*). За *TA* клонирање неопходно је било додати аденинске наставке на 3' крајеве ланца ДНК коришћењем *AmpliTaQ Gold* ДНК полимеразе. Реакциона смеша је инкубирана на 72 °C у трајању од 20 минута. Детаљни услови реакције наведени су у Табели 9.

Табела 9. Састав реакционе смеше за додавање аденинских наставка на ДНК ланац

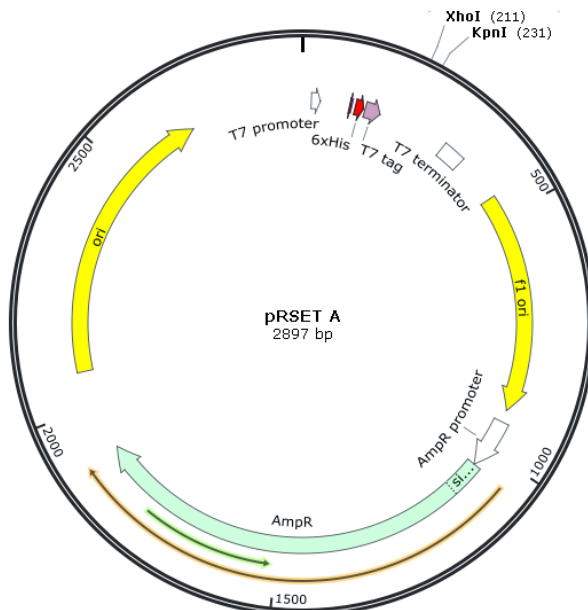
Компонента	По реакцији (60 μ l)
10 x реакциони пуфер	6,5 μ l
10 mM <i>dNTP</i>	1,3 μ l
<i>AmpliTaQ Gold</i> ДНК полимеразе	0,3 μ l
<i>PCR</i> продукт	6,9 μ l
стерилна дејонизована вода	50 μ l

3.3.3.3. Клонирање засновано на рестрикционим ензимима

Рестрикциони ензими су протеини који препознају и секу специфична места на дволанчаном ДНК ланцу и за собом остављају кратке „лепљиве“ једноланчане секвенце (енг. *sticky ends*). Вектор од интереса се исеца истим ензимима као и ген од интереса, а до реакције спајања комплементарних крајева долази у реакцији са ензимом ДНК лигазом. Након проверавања исправности *TA* клонирања секвенцирањем, које је обавио комерцијални сервис, уследило је исецање гена од интереса из вектора *pTZ57R/T* и његово клонирање у *pRSETA* вектор за бактеријску експресију (Слика 14). У циљу клонирања гена од интереса у вектор *pRSETA* на секвенце прајмера додато је и рестрикционо место које омогућава спајање гена са вектором (секвенца прајмера дата у Табели 7).

Сечење рестрикционим ензимима коришћено је и у циљу потврде успешности клонирања жељеног гена у вектор. Вектор *pRSETA* који је коришћен за експресију гена кандидата који кодирају за ензиме β -глукозидазу поседује *T7* промотор за високи ниво експресије клонираног гена. На *N* – терминусу поседује секвенцу од 6 хистидина (*6xHis tag*)

која омогућава пречишћавање синтетисаног протеина и детекцију након пречишћавања (Слика 14). Вектор такође поседује ген за отпорност на антибиотик ампицилин који омогућава селекцију успешно трансформисаних бактеријских колонија.



Слика 14. Мапа вектора *pRSETA* коришћеног за експресију у бактерији *E. coli*

Исецање рестрикционим ензимима обављено је помоћу ензима *FastDigest KpnI* и *FastDigest XhoI* (*Thermo Scientific*, САД). Састав реакционе смеше дат је у Табели 10.

Табела 10. Састав реакционе смеше за дигестију рестрикционим ензимима

Компонента	По реакцији (40 μ l)
<i>10X FastDigest Buffer</i>	4 μ l
<i>FastDigest KpnI</i>	2 μ l
<i>FastDigest XhoI</i>	2 μ l
ДНК	30 μ l
стерилна дејонизована вода	2 μ l

Инкубација реакционе смеше је након сат времена на температури од 37 °C заустављена излагањем узорак температури од 80 °C током 10 минута. Исечени фрагменти су раздвојени на агарозном гелу и пречишћени коришћењем комерцијалног комплета *GeneJET Gel Extraction* (поглавље 3.5.2). Концентрација изолованих ДНК фрагмената и вектора одређена је спектрофотометријски (*N60 Nano-Photometer®*, *Implen GmbH*, Немачка), а затим су ДНК фрагменти коришћени у реакцији лигације, тј, спајања вектора и жељеног фрагмента ДНК.

3.3.4. Трансформација бактерија *Escherichia coli*

3.3.4.1. Бактеријски сојеви

Mach1 - *Mach 1* сој *E. coli* је брзорастући сој, а визуелизација колонија након трансформације је могућа већ после 8 h. Овај сој поседује резистенцију на антибиотик ампицилин.

BL21 CodonPlus- RIL – сој *E. coli* дизајниран за хетерологу експресију протеина који садржи екстра копије *argU*, *ileY*, и *leuW* тРНК гена. *BL21 CodonPlus - RIL* тРНК може ограничити транслацију хетерологог протеина пореклом од организма који поседује АТ - богат геном. Овај бактеријски сој поседује резистенцију на антибитике канамицин и хлорамфеникол.

Глицеролски стокови бактеријских сојева су припремани тако што је 500 μ l течне бактеријске културе додавано у 500 μ l 50% стерилног глицерола. Компетентне ћелије и глицеролски стокови су чувани на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до употребе.

3.3.4.2. Припрема компетентних ћелија

Компетентне бактеријске ћелије *E. coli* (*Mach 1* и *BL21 CodonPlus- RIL*) које су коришћене за клонирање добијене су инокулацијом једне бактеријске колоније у 10 ml *LB* хранљиве подлоге и гајене преко ноћи на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, уз стално мешање на хоризонталној ротационој мешалици (220 обртаја у минути). Преконоћном бактеријском културом је затим инокулисано 200 ml *LB* хранљиве подлоге, а инкубација је настављена до достизања *OD*₆₀₀ 0,3 - 0,4. Након тога, култура је охлађена на леду, а хранљива подлога одстрањена центрифугирањем на $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ при брзини од 3000 g у трајању од 10 минута. Ћелије су затим растворене у 200 ml хладног 0,1 M *MgCl*₂, а након тога сталожене центрифугирањем на $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 2000 g у трајању од 15 минута. Супернатант је одливен, а сталожене ћелије растворене у 100 ml хладног *CaCl*₂ и инкубирани 20 минута на $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Растворене ћелије су сталожене центрифугирањем и након одливања супернатанта остатак је растворен у 2 ml хладног 85 mM *CaCl*₂ са 15% глицерола. Компетентне ћелије су затим замрзнуте у течном азоту и чуване на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до употребе.

3.3.4.3. Трансформација бактерија топлотним шоком

Бактеријске ћелије *E. coli* су трансформисане методом топлотног шока (енг. *heat shock method*). Претходно припремљене и замрзнуте компетентне ћелије су постепено отапане на леду. Ћелијама је затим додато 5 μ l лигационе смеше, а инкубација је настављена на леду током 30 минута. Ћелије су затим изложене топлотном шоку на $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ у трајању од 45 секунди, а затим су инкубирани на леду 5 минута. Након додавања 250 μ l течне *LB* хранљивог медијума суспензија је инкубирана током једног сата на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. По истеку времена инкубације 100 μ l бактеријске суспензије је засејано у стерилним условима на *LB* хранљиву агарозну подлогу са антибиотиком ампицилином и настављена је инкубација на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ преко ноћи.

3.3.4.4. Колонијски PCR

У циљу проверавања успешности трансформације бактерија плазмидом од интереса коришћена је *PCR* техника на колонијама (енг. *colony PCR*) и комерцијални *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)* комплет (*Thermo Scientific*, САД). Одабрана бактеријска колонија је врхом стерилног наставка, запремине 10 μ l инокулирана у 10 μ l воде, а затим је 5 μ l суспензије загрејано на $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ током 5 минута да би се омогућило лизирање ћелија. Састав реакционе смеше и услови за *PCR* реакције дати су у Табелама 11 и 12. Прајмери коришћени током експеримента представљени су у Табели 7.

За утврђивање дужине фрагмената коришћени су ДНК маркери *GeneRuler 50 bp DNA Ladder*, *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*, *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* и *GeneRuler High Range DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*, САД).

Табела 11. Састав реакционе смеше за *PCR* амплификацију са *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)* комплетом

Компонента	по реакцији (20 μ l)
<i>DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)</i>	10 μ l
10 μ M <i>F</i> прајмер	1 μ l
10 μ M <i>R</i> прајмер	1 μ l
бактеријска суспензија	5 μ l
стерилна дејонизована вода	2 μ l

Табела 12. Параметри програма за извођење *PCR* амплификације са *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)* комплетом

Корак	T ($^{\circ}$ C)	време трајања	број циклуса
иницијална денатурација	95	3 минута	1
денатурација	95	30 секунди	
везивање прајмера	58	30 секунди	35
Екстензија	72	1 минут	
финална екстензија	72	10 минута	1

Бактеријске колоније код којих је потврђена трансформација су инокулиране у 10 ml течне *LB* подлоге са одговарајућим антибиотиком и инкубиране преко ноћи на 37 $^{\circ}$ C уз стално мешање на хоризонталној ротационој мешалици (220 обртаја у минути). Наведене колоније су даље коришћене за изолацију плаزمида који носи циљани ген. Појединачне колоније трансформисаних бактерија су мешане са стерилним 50% раствором глицерола у односу 1:1 (v:v) и чуване на –80 $^{\circ}$ C до употребе.

3.3.5. Изолација плазмида из бактеријских колонија

Плазмиди су изоловани из бактерија коришћењем комерцијалног комплета за изолацију *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, САД)*, као и методом алкалне лизе.

3.3.5.1. Изолација плазмида помоћу комерцијалног комплета *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*

Преконоћне културе бактеријских ћелија су сакупљене и центрифугиране на 10000 g. Супернатант је одбачен, а у остатак је додато 250 ml раствора *Resuspension Solution*. Узорци су промешани, а затим је у сваки узорак додато по 250 ml раствора *Lysis Solution*. Микротубе са узорцима су лагано промешане инвертовањем, па је у узорке додато по 350 ml раствора *Neutralization Solution*. Након лаганог мешања узорци су центрифугирани 5 минута на 10000 g. Супернатант је пребачен у *GeneJET Spin Column* колоне за изолацију и центрифугиран на 10000 g током једног минута. Колона је испрана са 500 ml раствора *Wash Solution* и центрифугирана на 10000 g током једног минута. Процес центрифугирања је затим поновљен још једном у циљу уклањања вишка течности. Плазмид је елуиран са колоне центрифугирањем на 10000 g током 2 минута помоћу 50 μ l раствора *Elution Buffer*. Концентрација изолованог плазмида одређена је спектрофотометријски (*N60 Nano-Photometer®*, *Implen GmbH*, Немачка).

3.3.5.2. Изолација плаزمида техником алкалне лизе

Бактеријске ћелије су сталожене центрифугирањем 4 ml суспензије на 10000 g, а остатак је растворен у 200 μ l раствора I (100 μ g ml⁻¹ рибонуклеаза А (*ribonuclease A*, *RNase A*, *Thermo Scientific*, САД), 50 mM Tris pH 8,0) уз интензивно мешање. У смешу је затим додато 200 μ l раствора II (200 mM NaOH, 1% SDS), микротубе су лагано промешане инвертовањем, а затим је додато 200 μ l раствора III (3M калијум ацетат pH 5,5). Након формирања белог преципитата узорци су центрифугирани током 10 минута на 12000 g. У супернатант је затим додато 900 μ l 100% етанола. Узорци су промешани инвертовањем и центрифугирани током 20 минута на 12000 g. Супернатант је одбачен и у остатак је додато 100 μ l ледено хладног 75% етанола, а затим је смеша центрифугирана током 30 секунди на 10000 g. Супернатант је одбачен, а остатак осушен у ламинарној комори током 15 минута и након тога растворен у 50 μ l стерилне дејонизоване воде. Концентрације изолованих плаزمида су измерене спектрофотометријски (*N60 Nano-Photometer*®, *Implen GmbH*, Немачка).

3.3.5.3. Провера успешности изолације плазмида *pRSETA* који носи ген од интереса

Метода *PCR* амплификације коришћена је за проверу успешности клонирања на изолованим плазмидима, са прајмерима специфичним за вектор *pRSETA*. У ову сврху коришћена је *Phusion Hot Start II* ДНК полимераз (*Thermo Scientific*, САД). Услови реакције и услови амплификације дати су у Табелама 13 и 14.

Табела 13. Састав реакционе смеше за *PCR* амплификацију са *Phusion Hot Start II* ДНК полимеразом

Компонента	По реакцији (20 μ l)
5X <i>Phusion HF</i> реакциони пуфер	4 μ l
10 mM смеша <i>dNTP</i>	0,4 μ l
10 μ l <i>F</i> прајмер	1 μ l
10 μ l <i>R</i> прајмер	1 μ l
ДНК	1 μ l
<i>Phusion Hot Start II</i> ДНК полимераз	0,2 μ l
стерилна дејонизована вода	12,4 μ l

Табела 14. Програм извођења *PCR* амплификације са *Phusion Hot Start II* ДНК полимеразом

Корак	T (°C)	време трајања	број циклуса
иницијална денатурација	98	30 секунди	1
денатурација	98	20 секунди	
везивање прајмера	68	30 секунди	35
екстензија	72	1 минут	
финална екстензија	72	5 минута	1

3.3.6. Индукција експресије и изолација рекомбинантног протеина

3.3.6.1. Индукција експресије рекомбинантног протеина у бактеријама

Појединачне колоније трансформисаних *BL21 CodonPlus E. coli* пребачене су у 20 ml *LB* течне подлоге са додатком антибиотика канамицина (50 μ g ml⁻¹), ампицилина (50 μ g ml⁻¹) и хлорамфеникола (17 μ g ml⁻¹). Колоније су инкубирани на 37 °C преко ноћи уз стално мешање

(220 обртаја у минути). Следећег дана измерена је оптичка густина (OD_{600}) преконоћне бактеријске културе, која је затим искоришћена за инокулацију 200 ml 2 X YT течне подлоге са додатком одговарајућих концентрација канамицина, ампицилина и хлорамфеникола тако да почетна OD_{600} буде 0,1. У циљу оптимизовања услова за експресију гена у бактеријским ћелијама тестирани су различити услови гајења бактерија и индукције експресије. Индукција синтезе протеина је тестирана на различитим вредностима $OD_{600} = 0,4$, $OD_{600} = 0,6$ и $OD_{600} = 0,8$ са четири различите концентрације изо-пропил- β -D-тиогалактозида (*IPTG*): 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM и 1 mM. Поред тога, тестиран је и утицај температуре након индукције додавањем *IPTG*; бактерије су гајене на 18 °C, 21 °C, и 37 °C током 1 h, 2 h, 3 h и 4 h. Оптимална синтеза циљаног протеина је постигнута гајењем бактеријске културе на 37 °C уз стално мешање (220 обртаја у минути) до достизања OD_{600} од 0,4. Индукција синтезе је постигнута додавањем *IPTG* у финалној концентрацији 0,1 mM. Након индукције бактерије су гајене на ротационој мешалици током 4 сата на 220 обртаја у минути и при температури од 21 °C. По истеку времена бактеријске ћелије су сакупљане центрифугирањем на 4000 g током 10 минута и чуване на -80 °C.

3.3.6.2. Изолација рекомбинантних протеина из *Escherichia coli*

Експресиони вектор *pRSETA* поседује N-терминални хексахистидински реп који омогућава пречишћавање обележеног протеина коришћењем Ni^{2+} - NTA агарозе. Ni^{2+} - NTA агароза се користи за афинитетну хроматографију, при чему се хистидински остаци протеина везују преко имидазолног прстена за јоне никла. Имидазол присутан у високим концентрацијама у елуционом пуферу тежи везивању са јонима никла, па се на овај начин синтетисани протеин може издвојити.

Ni^{2+} -NTA агароза (*Qiagen*, САД) је уравнотежена тако што је 400 μ l агарозе центрифугирано на 12000 g током 2 минута, супернатант одбачен, а у агарозу додато 200 μ l пуфера за лизу (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM $NaCl$, 10 mM имидазол, pH 8,0). Бактеријске ћелије су постепено отапане на леду током 15 минута, а затим растворене у 500 μ l лизирајућег пуфера уз додаток лизозима (*Sigma Aldrich*, Немачка) у концентрацији 1 mg ml⁻¹ и инкубиране на леду током 30 минута. Лизирани ћелије су центрифугиране на 12000 g током 10 минута, на 4 °C. Супернатант је пребачен у тубу са уравнотеженом Ni^{2+} -NTA агарозом и инкубиран током једног сата на 4 °C уз стално мешање да би се омогућило везивање обележених протеина за агарозу. По истеку времена инкубације смеша је центрифугирана на 12000 g током 5 минута. Супернатант са протеинима који се нису везали за агарозу је одбачен, агароза је испрана три пута са по 500 μ l пуфера за испирање (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM $NaCl$, 50 mM имидазол, pH 8,0) и центрифугирана током 1 минута на 12000 g. Протеини који су се везали за агарозу су елуирани три пута са по 80 μ l пуфера за елуцију (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM $NaCl$, 250 mM имидазол, pH 10,2). Успешност изолације рекомбинантног протеина проверена је SDS електрофорезом и имуноблот анализом.

Концентрација изолованог протеина одређена је коришћењем комерцијалног комплета *Qubit® Protein Assay Kit* (*Thermo Fisher*, САД), по упутству произвођача.

3.3.6.3. Електрофоретско раздвајање протеина

За раздвајање и детекцију синтетисаних протеина коришћена је метода електрофорезе на денатуришућем полиакриламидном гелу *SDS-PAGE* (енг. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) и *Mini-Protein II* систем за електрофорезу (*Bio-Rad*, *Richmond*, Канада). Дисконтинуирани SDS полиакриламидни гел састављен од 5% гела за концентровање (енг. *stacking gel*) и 10% гела за раздвајање узорача (енг. *running gel*), направљен је по протоколу из Табеле 15.

Табела 15. Састав полиакриламидног гела за SDS електрофорезу

Компонента	10% (10 ml)	5% (5 ml)
30% акриламид 0,8% N,N-метиленбисакриламид	3,35 ml	0,83 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,8 ml	0,97 ml
Вода	3,8 ml	3,16 ml
TEMED	15 μ l	7,5 μ l
10% APS	30 μ l	15 μ l
10% SDS	100 μ l	50 μ l

Протеински узорци су растворени у пуферу за узорке у односу 1:1 (v:v) и денатурирани загревањем на 95 °C током 5 минута. Састав пуфера за узорке је представљен у Табели 16.

Табела 16. Састав пуфера за узорке за SDS електрофорезу

Компонента	10 ml	финална концентрација
1M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml	125 mM
глицерол	2 ml	20%
1% бромфенол плаво	0,2 ml	0,3 mM
10% SDS	4 ml	40%
β -меркаптоетанол	0,2 ml	2%
дејонизована вода	2,35 ml	

Узорци протеина су пре електрофорезе охлађени на собној температури и центрифугирани на 10000 g током 5 минута. Електрофореза се одвијала у Tris- глицинском пуферу (192 mM глицин, 0,1% SDS, 25 mM Tris – HCl, pH 8,8) на собној температури током 90 минута, при константном напону од 120 V. Након електрофорезе гел са узорцима је инкубиран у раствору за бојење (0,1%, Coomassie brilliant blue R 250, 5% метанол, 10% сирћетна киселина) током 45 минута, а затим обезбојаван наредних 16 сати у раствору за обезбојавање (15% метанол, 7% сирћетна киселина) уз мешање и повремену замену раствора. Идентификација молекулске масе протеина вршена је на основу поређења са комерцијалном смешом протеина познате молекулске масе (*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific, САД).

3.3.6.4. Имунодетекција протеина (енг. *Immuno blot analysis*)

Након денатуришуће електрофорезе протеини су са полиакриламидног гела преношени на мембрану од поливинилиден флуорида (PVDF, Amersham Biosciences, САД) коришћењем система за електротрансфер *Mini Trans-Blot Module* (Biorad, САД). Пренос протеина са гела на мембрану је вршен на 4 °C током 90 минута при сталном напону од 60 V. Након тога је мембрана инкубирана преко ноћи на 4 °C у 10% раствору безмасног млека (енг. *NFDM – non fat dry milk*) раствореног у T-PBS пуферу (енг. *Phosphate-Buffered Saline + 0,05 Tween-20*). PBS пуфер (pH 7,4) садржао је 8 g l⁻¹ NaCl, 0,2 g l⁻¹ KCl, 3,72 g l⁻¹ Na₂HPO₄ × 12H₂O и 0,24 g l⁻¹ KH₂PO₄.

Присуство протеина обележених са 6 хистидина потврђено је коришћењем антитела *His-probe Antibody* (sc-53073 Santa Cruz Biotechnology, САД). Антитела су растворена у односу 1:100 (v:v) у 5% NFDM, а инкубација мембране са примарним антителима трајала је

120 минута на собној температури уз стално мешање. Мембрана је затим испрана неколико пута у *T-PBS* пуферу на собној температури. Секундарна антитела *Goat Anti-Mouse IgG-HPR* (*Agrisera Antibodies*, Шведска) растворена су у односу 1:5000 (v:v) у 10% *NFDM*, а услови инкубације су били исти као и за примарна антитела.

Детекција протеина извршена је техником појачане хемилуминисценције (енг. *ECL - Enhanced Chemi Luminescence*). Мембрана је инкубирана током 5 минута на собној температури у раствору за хемилуминисценцију (100 mM *Tris-HCl* pH 8,5; 0,2 mM *p*-кумарна киселина, 1,25 mM 3-амино фталидразид и 1,7 μ l 30% H_2O_2). Након инкубације детекција сигнала је вршена експозицијом на радиографском филму (*Medical X-ray Green / MXG Film, Carestream Health*, САД) у трајању од 10 минута.

3.3.7. Анализа активности рекомбинантног протеина

Активност протеина изолованог из бактерија испитана је коришћењем комерцијалног супстрата 4-нитрофенил- β -D-глукопиранозида (*pNPG*) (*Sigma Aldrich*, Немачка) у цитрат фосфатном пуферу. За одређивање оптималних услова за извођење реакције варирано је неколико фактора: реакција је извођена у 50 mM и 100 mM цитрат фосфатном пуферу различитих *pH* вредности (*pH* 5,0; 5,5 и 6,0); тестиране су различите количине супстрата и протеина, време инкубирања (16 h, 24 h и 48 h), као и температура (30 °C или 40 °C). Након инкубације реакција је заустављена додавањем исте запремине (1:1=v:v) ледено хладног раствора 1M Na_2CO_3 . Апсорбанца ослобођене хромофоре 4-нитрофенола (*Sigma Aldrich*, Немачка) измерена је спектрофотометријски (*Agilent Technologies, Waldbronn*, Немачка) на 410 nm.

Активност пречишћеног протеина тестирана је такође на екстракту кичице који је припремљен по упутству из поглавља 3.3.6.2. Метанолни екстракт кичице (2,5 μ l, 5 μ l, 10 μ l и 20 μ l) упарен је до сува под вакуумом (*Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg*, Немачка) и растворен у 50 μ l 50 mM цитрат фосфатног пуфера (*pH* 5,5). Овако припремљен супстрат додаван је у реакционе смеше са различитим количинама испитиваног ензима (10 μ g и 20 μ g) до коначне запремине од 300 μ l. Узорци су промешани и инкубирани у различитим временским интервалима (16 h, 24 h и 48 h) на температури од 37 °C. Након периода инкубације узорцима је додато 700 μ l метанола, поново су промешани и центрифугирани током 10 минута на 10000 g. Супернатант је профильтриран кроз целулозне филтере (величина пора 0,2 μ m) (*Agilent Technologies, Santa Clara*, САД) и даље анализиран као што је описано у поглављу 3.2.5. Контролни узорци су уместо изолованог протеина садржали исту запремину пуфера за елуцију који је коришћен приликом изолације ензима из бактерија.

За проверу активности изолованих протеина коришћени су и комерцијални стандарди следећих једињења: епидеоксилоганинска киселина (ДК), ЛОГ, СЛОГ, СВ, СВМ, ГП, апигетрин (АП), изокверцитрин (ИК) и витексин (ВТ), по горе наведеном протоколу. Финална концентрација растворених стандардних једињења је износила 3 μ g ml⁻¹. Процедура је описана у претходном пасусу.

3.4. Филогенетске анализе

Поређењем аминокиселинских секвенци гена кандидата за β -глукозидазу и иридоид синтазу кичице са *NCBI* (енг. *National Center for Biotechnology Information*) базом података за секвенце пептида издвојене су секвенце за глукозидне хидролазе и иридоид синтазе или

прогестерон-5- β -редуктазе различитих биљних врста. Филогенетско стабло сродности аминокиселинских секвенци је конструисано *neighbor-joining* методом (Saitou и Nei, 1987) помоћу софтверског пакета *MEGA 6* (Tamura и сар., 2013) или коришћењем *neighbor-joining* методе *CLC sequence viewer 8.0* софтверског пакета.

Секвенце раукафрицин β -глукозидазе добијене су из *Uniprot* базе протеина (www.uniprot.org). Хомологим моделовањем у програму *MODELLER* (Yang и сар., 2012) добијене су почетне 3D структуре оба изолована ензима.

3.5. Хранљиве подлоге

Састав $\frac{1}{2}$ MS хранљиве подлоге за гајење кичице приказан је у Табели 17, док је састав хранљивих подлога за гајење микроорганизама представљен у Табели 18. Подлоге су стерилисане 25 минута на температури од 121 °C. Одговарајући антибиотици и *MeJA* су додавани у претходно стерилисане подлоге за гајење након хлађења до 50 °C.

Табела 17. Састав $\frac{1}{2}$ MS хранљиве подлоге за гајење биљака у култури *in vitro*

<i>Murashige</i> и <i>Skoog</i> подлога ($\frac{1}{2}$ MS)	финална концентрација
смеша макро елемената	5%
смеша микро елемената	0,10%
смеша витамина	0,10%
Гвожђе	0,50%
Сахароза	2%
агар*	7%

* при прављењу течних подлога није додаван агар

Табела 18. Састав хранљивих подлога за гајење култура микроорганизама

<i>Luria Bertani</i> (LB) подлога	финална концентрација
екстракт квасца	0,5%
Триптон	1,0%
<i>NaCl</i>	1,0%
агар*	2,0%
2 X YT подлога	финална концентрација
екстракт квасца	1,0%
Триптон	1,60%
<i>NaCl</i>	0,50%
<i>Mueller Hinton agar</i> (MHA) подлога	финална концентрација
Агар	2%
киселински хидролизат казеина	1,75%
инфузум говеђег срца	2%
Скроб	1,50%
<i>Malt agar</i> (MA) подлога	финална концентрација
Агар	0,5%
сладни екстракт	1,5%

Кромпир декстрозни агар (<i>PDB</i>)	финална концентрација
Декстроza	2%
екстракт кромпира	0,40%
Агар	1,50%
<i>Triptic Soy Broth (TSB)</i> подлога	финална концентрација
Казеин	1,50%
Пептон	0,50%
<i>NaCl</i>	0,50%
<i>K₂HPO₄</i>	0.10%

* при прављењу течних подлога није додаван агар

3.6. Статистичка обрада података

За статистичку обраду података у оквиру ове дисертације коришћен је софтверски пакет *MiniTab* (Државни Универзитет у Пенсилванији - *Pennsylvania State University*, САД), при чему је статистичка значајност тестирана анализом варијансе (*ANOVA*) уз коришћење *post-hoc* поређења по Фишеру (енг. *Fisher LSD post hoc test*) ($p < 0,05$) или Студентовим *t*-тестом ($p < 0,05$). За графичко приказивање резултата коришћен је програм *Microsoft Office Excel*. Статистичке анализе резултата добијених испитивањем експресије гена су урађене у *R* програмском језику (*Team*, 2018) уз помоћ пакета *MASS* (*Venables* и *Ripley*, 2013) и *gplots* (*Warnes* и сар., 2016). Зависност између релативне експресије сваког од испитиваних гена ($\Delta\Delta Ct$ вредност) као зависне променљиве и времена након повреде, стања листа (ПЛ или ЦЛ) и њихове међусобне интеракције као категорички независних променљивих, испитана је факторијалном анализом варијансе. Пре *ANOVA* урађена је *Box-Cox* трансформација (*Box* и *Cox*, 1964) ради стабилизације варијансе зависних променљивих. Након анализе варијансе за значајне независне променљиве урађена су *post-hoc* поређења по Тукију (енг. *Tukey post hoc test*) ($p < 0,05$). Корегулација експресије испитана је *Pearson* корелацијом релативних експресија ($\Delta\Delta Ct$ вредност). Добијена корелациона матрица је визуелизована топлотном мапом (енг. *heatmap*). Распоред гена у топлотној мапи одређен је на основу хијерархијске анализе кластера која је урађена на основу дистанционе матрице која је била једнака 1 – корелациона матрица експресије гена (минимална дистанца одговара апсолутно позитивној *Pearson* корелацији између експресије гена, док максимална дистанца одговара апсолутно негативној *Pearson* корелацији). Агломерација кластера је урађена методом потпуног повезивања (енг. *complete linkage*).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Оптимизација аналитичких метода за идентификацију и квантификацију секоиридоидних глукозида и њихових агликона

За потребе профилисања секоиридоида кичице (*C. erythraea*) било је неопходно развити аналитичке методе за идентификацију и квантификацију иридоида и секоиридоидних глукозида, као и њихових агликона. Како агликони настају деглукозилацијом и прилично су нестабилни, њихова карактеризација на *UHPLC/Orbitrap-MS* и *UHPLC/DAD/qqqMS* уређајима вршена је након хидролизе метанолних екстраката и стандарда секоиридоидних глукозида. За хидролизу метанолних екстраката три месеца старих биљака *C. erythraea* гајених у култури *in vitro* и чистих секоиридоида (СВ, СВМ и ГП) у реакцији коју катализује ензим β -глукозидаза коришћен је комерцијални ензим изолован из бадема. Поред тога, испитано је како измењен однос глукозида и њихових агликона као последица хидролизе екстраката кичице утиче на антиоксидативна и антимикуробна својства.

4.1.1. *UHPLC/Orbitrap-MS* хемијска карактеризација метанолних екстраката *C. erythraea*

UHPLC/Orbitrap-MS анализа хидролизованых (ХМЕ) и нехидролизованых (МЕ) метанолних екстраката *C. erythraea* вршена је у негативном јонизационом режиму. У екстрактима је детектовано укупно 78 једињења која припадају фенолним киселинама, флавоноидима, ксантонима и секоиридоидима (Табела 19). Од наведених једињења 29 је потврђено коришћењем стандарда, док су остала једињења идентификована на основу тачне масе $[M-H]^-$ депротонованог молекула и његове *MS* фрагментације, као и поређењем са доступним литературним подацима. Фенолне киселине идентификоване у екстрактима кичице припадају дериватима хидроксибензоеве киселине: протокатехинска (2), гална (1), гентизинска (4), *p*-хидроксибензоева (5), ванилинска (9), *p*-хидроксифенилсирћетна (6) и сиригинска киселина (10), као и дериватима хидроксициметне киселине хлорогена (3), кофеинска (8), *p*-кумарна (11), синапинска (12) и циметна киселина (14). Поред наведених фенолних киселина у екстрактима су детектовани хексозид кофеинске киселине (7) и кониферил алдехид (13). Међу флавоноид-гликозидима, који су идентификовани на основу *MS*⁴ фрагментације агликона, већина припада групи флавонол *O*-гликозида (камферол, кверцетин и изо-рамнетин). У састав идентификованих гликозида улазе 2, 3 или 4 јединице шећера (које одговарају масама рамнозе и глукозе, 146 *Da* и 162 *Da*) и *p*-кумаринска киселина (маса 146 *Da*). Коришћењем масене спектрометрије високе резолуције и анализом *MS* фрагментационих профила, може се само претпоставити како изгледа њихова структура, али тачан положај гликозилације се не може у овом случају одредити коришћењем само наведене технике. Присуство два деривата лутеолина, лутеолин 6-*C*-глукозида (18) и лутеолин 7-*O*-глукозида (28), установљено је у МЕ, али не и у ХМЕ. Нарингенин (53) и нарингенин 7-*O*-неохесперозид (34) су у МЕ и ХМЕ присутни у приближно једнаким количинама (Слика 14). Агликони флавоноида: лутеолин (51), кверцетин (52), апигенин (54) и камферол (55) пронађени су у МЕ и ХМЕ при чему су нешто заступљенији у ХМЕ, што је последица хидролизе ХМЕ β -глукозидазом (Слика 15). У МЕ и ХМЕ кичице детектовано је 15 деривата ксантона од којих је присуство само два, декузатина (66) и метилбелидифолина

(67), потврђено стандардима, при чему разлике између МЕ и ХМЕ у садржају једињења **56-70** нису забележене (Слика 15).

Сви детектовани секоиридоиди (**71-78**) присутни су у МЕ и ХМЕ (Слика 15). Секоиридоиди СВ, СВМ и ГП су идентификовани коришћењем стандарда, али су били видљиви у негативном јонизационом режиму као адукти сирћетне киселине $[M-H+CH_3COOH]^-$ што је већ описано у раду *Vanjanac* и сарадника (2017). Једињење **71** (Табела 19) са молекуларним јоном на $375 m/z$ и на ретенционом времену $t_R=4.56 min$ је прелиминарно идентификовано као ЛК на основу фрагментационог пута доступног у литератури (*Kucharska* и *Fecka*, 2016). Једињење **72** идентификовано је као секологанозид са молекуларним јоном на $389 m/z$ и на ретенционом времену $t_R=4.88 min$ на основу описаног *MS* фрагментационог пута. Фрагмент на $345 m/z$ настаје губитком CO_2 , док фрагменти од 209 и $165 m/z$ настају губитком хексозе ($-180 Da$) или губитком хексозе и CO_2 ($-224 Da$) (*Li* и сар., 2015). Једињења кафеоил 6'-секологанозид (**76**), ферулоил 6'-секологанозид (**77**) и *p*-кумароил 6'-секологанозид (**78**) су деривати секологанозида. Једињење **78** на $535 m/z$ и ретенционом времену $t_R=7.61 min$ показује MS^2 пик на $491 m/z$ који настаје услед губитка CO_2 , као и пикове на $517 m/z$ ($[M-H-H_2O]^-$), $447 m/z$, $389 m/z$, $345 m/z$ и $209 m/z$. Јон на $447 m/z$ настаје губитком молекула CO_2 а фрагмент јон на $389 m/z$ настаје губитком ацил групе ($-146 Da$) на 6-*O* позицији хексозе. Фрагмент јон на $345 m/z$ настаје од јона на $389 m/z$ губитком CO_2 ($[M-H-p\text{-кумароил}-CO_2]^-$), а јон на $209 m/z$ одговара ($[M-H-p\text{-кумароил}-C_6H_{12}O_6]^-$) фрагменту. MS^3 спектар једињења **78** показује пик на $145 m/z$ ($[p\text{-кумарна киселина}-H-H_2O]^-$) и друге MS^3 пикове. Фрагмент јони на 325 и $307 m/z$ одговарају масама ацил хексозе ($[M-H\text{-иридоид}]^-$) и дехидратисане ацил хексозе, наведеним редом. Присуство ова два фрагмента а одсуство осталих фрагмената, указује да је интерглукозидна веза између њих 1→6 типа (*Pavlović* и сар., 2016) и да је веза између ацил групе и хексозе са иридоидом успостављена преко хексозе. Фрагменти на 265 , 235 и $205 m/z$ настају од јона на $325 m/z$ одвајањем молекула шећера (губитак од 60 , 90 и $120 Da$ наведеним редом). MS^4 спектар показује пик на $117 m/z$ који одговара јону $[p\text{-кумарна киселина}-H-H_2O-CO]^-$. Сличан облик фрагментације забележен је и за једињења **76** и **77**. Оваква врста секоиридоида забележена је претходно у узорцима маслине (*Innocenti* и сар., 2006), а у овој дисертацији су први пут описани код врсте *C. erythraea*.

Табела 19. UHPLC–MS⁴ Orbitrap карактеризација метанолних екстракта *C. erythraea* у негативном јонизационом режиму.

Пик бр.	t_R , min	Име једињења	Молекулска формула, [M–H] [–]	Израчуната маса, [M–H] [–]	Нађена маса, [M–H] [–]	Δppm	MS ² Фрагменти, (% интензитет)	MS ³ Фрагменти, (% интензитет)	MS ⁴ Фрагменти, (% интензитет)
Фенолне киселине и њихови деривати									
1	2,08	Гална киселина	C ₇ H ₅ O ₅ [–]	169,01425	169,01390	2,07	125 (100)	107 (100)	–
2	4,01	Протокатехинска киселина	C ₇ H ₅ O ₄ [–]	153,01933	153,01891	2,74	109 (100), 95(75), 79(20), 59(10)	81 (100), 68(25), 65(15)	–
3	4,97	Хлорогена киселина	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ [–]	353,08781	353,08694	2,46	191 (100), 179(5)	173(75), 127 (100), 111(40), 93(60), 85(90)	109(40), 99(50), 85(100)
4	5,03	Гентизинска киселина	C ₇ H ₅ O ₄ [–]	153,01933	153,01889	2,88	136(5), 125(10), 109 (100), 95(20), 79(10)	81(85), 67 (100), 63(60)	–
5	5,05	<i>p</i> -Хидроксибензоева киселина	C ₇ H ₅ O ₃ [–]	137,02442	137,02414	2,04	109(10), 93 (100)	93 (100)	–
6	5,28	<i>p</i> -Хидроксифенилсирћетна киселина	C ₈ H ₇ O ₃ [–]	151,04007	151,03964	2,85	121(15), 107 (100), 95(70), 79(15), 59(25)	123(10), 95(30), 79 (100), 69(10), 51(20)	108(100)
7	5,49	Хексозид кофеинске киселине	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ [–]	341,08781	341,08713	1,99	271(10), 253(70), 179(80), 135 (100), 109(30)	109 (100)	–
8	5,50	Кофеинска киселина	C ₉ H ₇ O ₄ [–]	179,03498	179,03471	1,51	135 (100)	135(60), 117(15), 107 (100), 91(55), 79(15)	–
9	5,53	Ванилинска киселина	C ₈ H ₇ O ₄ [–]	167,03498	167,03453	2,69	153(10), 152(80), 124(10), 123 (100), 108(20)	108 (100)	123(30), 80(35), 78(100)
10	5,69	Сирингинска киселина	C ₉ H ₉ O ₅ [–]	197,04555	197,04498	2,89	183 (100), 153(40), 138(10)	167 (100), 138(10), 123(5)	–
11	6,38	<i>p</i> -Кумарна киселина	C ₉ H ₇ O ₃ [–]	163,04007	163,03972	2,15	119 (100)	119(60), 101(20), 93(25), 91 (100), 72(10)	–
12	6,73	Синапинска киселина	C ₁₁ H ₁₁ O ₅ [–]	223,06120	223,06055	2,91	208 (100), 179(30), 164(20)	193(10), 164 (100), 149(15), 135(5)	149(100), 135(35)
13	7,63	Кониферил алдехид	C ₁₀ H ₉ O ₃ [–]	177,05572	177,05527	2,54	163(10), 162 (100)	134 (100), 133(40), 120(20), 106(30)	106(100), 65(80)

14	8,93	Циметна киселина	$C_9H_7O_2^-$	147,04515	147,04500	1,02	104(10), 103 (100), 87(10)	119 (100)	–
Гликозиди флавоноида									
15	5,07	Дериват кверцетин гликозида	$C_{39}H_{49}O_{24}^-$	901,26193	901,26080	1,25	756(30), 755 (100)	609(20), 591(20), 489(30), 301(40), 300 (100)	271(100), 255(50)
16	5,62	Дериват кверцетин гликозида	$C_{33}H_{39}O_{20}^-$	755,20402	755,20282	1,59	610(20), 609 (100), 477(5), 301(5)	343(20), 301 (100), 300(80), 271(15), 255(10)	271(100), 255(60), 179(80), 151(60)
17	5,71	Дериват кверцетин гликозида	$C_{48}H_{55}O_{27}^-$	1063,29362	1063,29199	1,53	917(60), 901 (100), 781(30), 755(80), 737(10)	755 (100)	609(15), 591(25), 489(20), 301(35), 300(100)
18	5,82	Лутеолин 6-С-глукозид	$C_{21}H_{19}O_{11}^-$	447,09274	447,09225	1,10	429(15), 357(55), 328(20), 327 (100)	299 (100)	255(100), 240(30), 213(45), 199(40), 175(40)
19	5,86	Дериват камферол гликозида	$C_{33}H_{39}O_{19}^-$	739,20910	739,20807	1,39	594(30), 593 (100)	447(5), 357(5), 237(20), 285 (100), 284(60)	257(40), 255(100), 241(20), 229(30), 151(20)
20	6,01	Дериват камферол гликозида	$C_{48}H_{55}O_{26}^-$	1047,29871	1047,29773	0,94	902(30), 901 (100), 739(10)	765(20), 739 (100), 721(10), 575(5), 285(5)	593(20), 575(100), 393(40), 285(85), 284(80)
21	6,20	Дериват кверцетин гликозида	$C_{42}H_{45}O_{23}^-$	917,23571	917,23547	0,26	755 (100)	635(5), 609 (100), 591(5), 301(20), 300(10)	343(20), 301(100), 300(60), 271(15), 255(10)
22	6,23	Кверцетин 3-О-рутинозид	$C_{27}H_{29}O_{16}^-$	609,14611	609,14435	2,89	343(10), 301 (100), 300(40), 271(10), 255(5)	179 (100), 151(78), 107(4)	151(100), 107(2)
23	6,25	Дериват камферол гликозида	$C_{48}H_{55}O_{25}^-$	1031,30379	1031,30322	0,55	886(40), 885 (100)	765(20), 739 (100), 721(20), 575(10), 285(10)	593(20), 575(100), 393(30), 285(60), 284(60)
24	6,28	Дериват кверцетин гликозида	$C_{48}H_{55}O_{26}^-$	1047,29871	1047,29785	0,82	902(40), 901 (100), 781(10), 755(20)	781(15), 755 (100), 739(10), 489(5), 300(5)	609(20), 591(40), 489(30), 301(50), 300(100)
25	6,36	Дериват изорамнетин гликозида	$C_{49}H_{57}O_{26}^-$	1061,31436	1061,31335	0,95	916(30), 915 (100)	795(20), 769 (100), 753(40), 751(20), 735(10)	737(20), 623(10), 605(70), 315(100), 300(20)
26	6,42	Дериват камферол гликозида	$C_{48}H_{55}O_{25}^-$	1031,30379	1031,30261	1,14	886(40), 885 (100)	765(20), 739 (100), 721(20), 575(10),	593(20), 575(100), 393(30), 285(60),

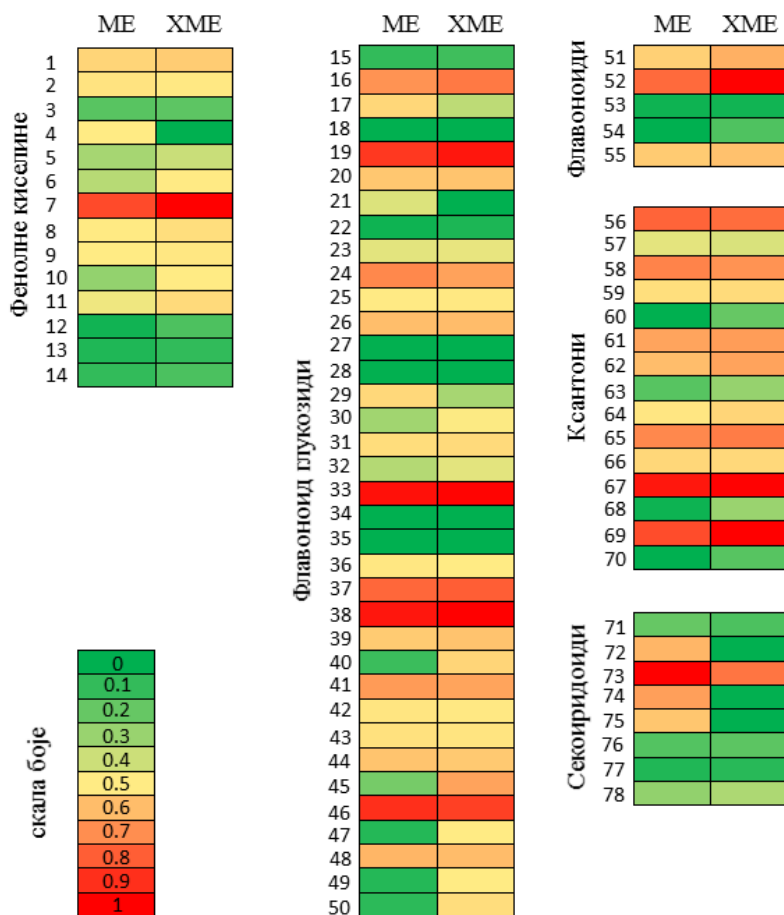
								285(10)	284(60)
27	6,44	Кверцетин 3-О-галактозид	$C_{21}H_{19}O_{12}^-$	463,08820	463,08734	1,86	301(100), 300(30)	273(25), 257(20), 179(100), 151(75)	151(100)
28	6,48	Лутеолин 7-О-глюкозид	$C_{21}H_{19}O_{11}^-$	447,09329	447,09222	2,39	285(100)	257(30), 241(100), 217(75), 199(85), 175(95)	241(5), 226(15), 213(30), 197(100)
29	6,50	Дериват кверцетин гликозида	$C_{42}H_{45}O_{23}^-$	917,23571	917,23450	1,32	772(30), 771(100), 755(10), 609(10)	635(5), 609(100), 301(5)	343(10), 301(100), 300(70), 271(10), 255(5)
30	6,53	Камферол 3-О-рутинозид	$C_{27}H_{29}O_{15}^-$	593,15119	593,14984	2,28	327(20), 285(80), 284(100), 255(10)	255(100), 227(10)	227(100), 211(60)
31	6,60	Дериват камферол гликозида	$C_{48}H_{55}O_{25}^-$	1031,30379	1031,30225	1,49	886(40), 885(100)	765(20), 739(100), 721(20), 575(10), 285(10)	593(20), 575(100), 393(30), 285(60), 284(60)
32	6,73	Изорамнетин 3-О-рутинозид	$C_{28}H_{31}O_{16}^-$	623,16176	623,16113	1,01	315(100), 300(20), 271(10), 255(5)	300(100), 287(5), 272(5)	271(100), 255(50), 151(5)
33	6,83	Дериват кверцетин гликозида	$C_{42}H_{45}O_{22}^-$	901,24080	901,23938	1,58	781(20), 755(100), 739(40), 575(10), 445(10)	609(100), 591(20), 489(10), 301(30), 300(40)	591(5), 343(20), 301(100), 300(60), 271(10)
34	6,86	Нарингенин 7-О-неосферозид	$C_{27}H_{31}O_{14}^-$	579,17193	579,17041	2,62	459(100), 357(5), 313(25), 271(45), 235(10)	441(30), 357(100), 339(30), 271(55), 235(85)	339(100), 169(20), 151(50), 125(20)
35	6,88	Камферол 3-О-глюкозид	$C_{21}H_{19}O_{11}^-$	447,09329	447,09219	2,46	327(20), 285(80), 284(100), 255(10)	255(100), 227(10)	227(100), 211(60)
36	6,98	Дериват изорамнетин гликозида	$C_{43}H_{47}O_{23}^-$	931,25136	931,25000	1,46	786(30), 785(100), 755(5), 623(5), 609(5)	623(100), 609(95), 469(10), 315(20), 300(30)	357(10), 315(100), 300(50), 271(10), 255(5)
37	7,15	Дериват кверцетин гликозида	$C_{42}H_{45}O_{22}^-$	901,24080	901,23987	1,03	756(30), 755(100), 609(5)	635(5), 609(100), 591(5), 301(20), 300(10)	591(5), 343(20), 301(100), 271(10)
38	7,18	Дериват камферол гликозида	$C_{42}H_{45}O_{21}^-$	885,24588	885,24567	0,24	740(20), 739(100)	619(10), 593(100), 575(20), 453(15), 285(90)	447(5), 327(40), 285(100), 284(60), 255(20)
39	7,34	Дериват изорамнетин гликозида	$C_{43}H_{47}O_{22}^-$	915,25645	915,25623	0,24	770(20), 769(100)	623(70), 607(90), 453(20), 315(100), 300(20)	300(100), 151(5)
40	7,51	Дериват кверцетин гликозида	$C_{36}H_{35}O_{18}^-$	755,18289	755,18201	1,17	635(5), 609(100), 591(5), 445(5),	343(20), 301(100), 300(80), 271(15),	271(100), 255(60), 179(80), 151(60)

41	7,54	Дериват камферол гликозида	$C_{42}H_{45}O_{21}^-$	885,24588	885,24438	1,69	301(20) 740(30), 739 (100)	255(10) 619(10), 593 (100), 575(20), 453(15), 285(90)	327(30), 285(100), 284(55), 255(20)
42	7,55	Дериват кверцетин гликозида	$C_{42}H_{45}O_{22}^-$	901,24080	901,23938	1,58	756(20), 755 (100), 609(5), 447(5), 301(5)	635(5), 609 (100), 591(10), 301(30), 300(10)	591(5), 343(20), 301(100), 271(15)
43	7,66	Дериват изорамнетин глюкозида	$C_{51}H_{59}O_{27}^-$	915,25645	915,25549	1,05	770(30), 769 (100)	623(80), 607(50), 453(20), 315 (100), 300(20)	300(100), 151(5)
44	7,71	Дериват кверцетин гликозида	$C_{42}H_{45}O_{22}^-$	901,24080	901,23950	1,44	756(20), 755 (100), 609(5), 447(5), 301(10)	635(5), 609 (100), 591(5), 301(30), 300(10)	591(5), 343(20), 301(100), 300(60), 271(15)
45	7,56	Дериват кверцетин гликозида	$C_{36}H_{35}O_{18}^-$	755,18289	755,18225	0,85	635(5), 609 (100), 591(5), 445(5), 301(25)	343(20), 301 (100), 300(80), 271(15), 255(10)	271(100), 255(60), 179(80), 151(60)
46	7,77	Дериват камферол гликозида	$C_{42}H_{45}O_{21}^-$	885,24588	885,24463	1,41	740(35), 739 (100)	619(10), 593(70), 575(20), 453(20), 285 (100)	257(50), 255(100), 241(30), 229(20), 151(70)
47	7,98	Дериват камферол гликозида	$C_{36}H_{35}O_{17}^-$	739,18797	739,18652	1,96	619(10), 593(80), 575(20), 453(15), 285 (100)	257(50), 255(100), 241(35), 229(20), 151(60)	255(10), 227(40), 211(100)
48	7,99	Дериват камферол гликозида	$C_{42}H_{45}O_{21}^-$	885,24588	885,24469	1,34	740(20), 739 (100)	619(10), 593(60), 575(20), 453(30), 285 (100)	257(50), 255(100), 241(35), 229(20), 151(60)
49	8,29	Дериват камферол гликозида	$C_{36}H_{35}O_{17}^-$	739,18797	739,18701	1,30	619(10), 593(90), 575(20), 453(20), 285 (100)	257(50), 255(100), 241(35), 229(20), 151(60)	255(20), 227(50), 211(100)
50	8,32	Дериват кверцетин гликозида	$C_{36}H_{35}O_{18}^-$	755,18289	755,18164	1,66	635(10), 609 (100), 591(10), 445(5), 301(35)	343(20), 301 (100), 300(80), 271(15), 255(10)	271(100), 255(60), 179(80), 151(60)
Агликони флавоноида									
51	8,43	Лутеолин	$C_{15}H_9O_6^-$	285,04046	285,03979	2,35	257(40), 241 (100), 217(50), 199(70), 175(70)	255(50), 227 (100), 211(75), 197(35), 183(85)	–
52	8,52	Кверцетин	$C_{15}H_9O_7^-$	301,03537	301,03461	2,52	283(15), 271(60), 257(25), 179 (100), 151(80)	151 (100)	107(100), 83(10)

53	9,28	Нарингенин	$C_{15}H_{11}O_5^-$	271,06120	271,06046	2,73	225(5), 177(10), 151 (100)	107 (100)	65(100)
54	9,30	Апигенин	$C_{15}H_9O_5^-$	269,04554	269,04495	2,19	225(5), 177(15), 151 (100)	65 (100)	–
55	9,45	Камферол	$C_{15}H_9O_6^-$	285,04046	285,03976	2,46	255 (100), 227(10)	211 (100), 195(5), 167(15)	211(40), 137(100)
Ксантони									
56	6,70	Тригидрокси триметокси ксантон <i>O</i> -пентозилгексозид	$C_{27}H_{31}O_{17}^-$	627,15667	627,15533	2,14	333 (100), 318(40), 303(30)	318 (100)	303(100)
57	7,08	Тригидрокси монометокси ксантон <i>O</i> -пентозилгексозид	$C_{25}H_{27}O_{15}^-$	567,13554	567,13458	1,69	552(10), 442(60), 273 (100), 258(60), 230(10)	258 (100)	230(100)
58	7,93	Дигидрокси тетраметокси ксантон <i>O</i> -пентозилгексозид	$C_{28}H_{33}O_{17}^-$	641,17232	641,17194	0,59	347 (100), 332(20), 317(10), 293(30)	332 (100)	317(100)
59	9,40	Тригидрокси монометокси ксантон 1	$C_{14}H_9O_6^-$	273,04046	273,03979	2,45	258 (100)	258(30), 241(10), 230 (100), 229(60), 202(40)	230(10), 202(80), 174(100), 160(20), 108(50)
60	9,52	Тригидрокси диметокси ксантон 1	$C_{15}H_{11}O_7^-$	303,05103	303,05020	2,74	288 (100)	273 (100), 259(5)	245(100)
61	9,62	Тригидрокси монометокси ксантон 2	$C_{14}H_9O_6^-$	273,04046	273,03973	2,67	258 (100)	258(5), 241(30), 230 (100), 229(95), 202(20)	229(20), 202(100), 185(20), 174(60), 157(30)
62	9,98	Тригидрокси монометокси ксантон 3	$C_{14}H_9O_6^-$	273,04046	273,03995	1,87	258 (100)	258(30), 230 (100), 229(60), 214(10), 202(30)	230(5), 213(20), 202(80), 174(100), 108(60)
63	10,69	Дигидрокси диметокси ксантон 1	$C_{15}H_{11}O_6^-$	287,05611	287,05533	2,72	272 (100)	257 (100)	229(100)
64	11,38	Тригидрокси монометокси ксантон 4	$C_{14}H_9O_6^-$	273,04046	273,03986	2,20	258 (100)	230 (100)	213(5), 202(40), 186(20), 174(20), 150(100)
65	11,52	Дигидрокси монометокси ксантон	$C_{14}H_9O_5^-$	257,04555	257,04480	2,92	242 (100)	242(10), 214 (100), 198(20), 186(80), 170(20)	186(100), 172(20), 170(25), 158(25)
66	11,62	Дигидрокси тетраметокси ксантон 1 (Декузатин)	$C_{17}H_{15}O_8^-$	347,07724	347,07639	2,45	332 (100), 317(10)	317 (100)	302(100), 289(25), 274(10), 246(5)

67	11,70	Дихидрокси диметокси ксантон 2 (Метилбелидифолин)	$C_{15}H_{11}O_6^-$	287,05611	287,05545	2,30	272(100)	257(100)	229(100)
68	11,94	Трихидрокси диметокси ксантон 2	$C_{15}H_{11}O_7^-$	303,05103	303,05017	2,84	288(100), 273(5)	273(100), 259(20)	245(100)
69	12,74	Трихидрокси триметокси ксантон	$C_{16}H_{13}O_8^-$	333,06159	333,06061	2,94	318(100)	303(100)	288(100), 285(50), 275(10), 257(5)
70	14,70	Дихидрокси тетраметокси ксантон 2	$C_{17}H_{15}O_8^-$	347,07724	347,07684	1,15	332(100)	317(100)	302(100), 289(5)
Секоиридоиди									
71	4,56	Логанинска киселина	$C_{16}H_{23}O_{10}^-$	375,12967	375,12888	2,11	213(100), 169(15), 151(5), 109(5)	169(100), 151(20), 125(25), 113(40), 99(55)	151(100), 125(10), 109(10), 99(15), 95(65)
72	4,88	Секологанозид	$C_{16}H_{21}O_{11}^-$	389,10894	389,10800	2,42	371(5), 345(100), 209(40), 165(20), 121(30)	183(80), 179(30), 165(100), 161(20), 143(40)	137(20), 123(10), 121(90), 59(100)
73	5,18	Сверцијамарин + CH_3COOH	$C_{18}H_{25}O_{12}^-$	433,13515	433,13425	2,08	372(20), 355(10), 179(100), 161(5), 143(5)	161(70), 143(100), 119(30), 89(90)	113(5), 101(10), 71(100)
74	5,53	Генциопикрин + CH_3COOH	$C_{18}H_{23}O_{11}^-$	415,12459	415,12384	1,81	355(10), 239(10), 179(100), 161(5), 143(5)	161(80), 143(100), 119(60), 89(80)	125(60), 101(50), 87(40), 71(100)
75	5,59	Сверозид + CH_3COOH	$C_{18}H_{25}O_{11}^-$	417,14024	417,13943	1,94	357(100), 195(60), 179(90), 161(10), 125(20)	195(40), 167(20), 151(30), 125(100)	81(100)
76	6,86	Кафеоил 6'-секологанозид	$C_{25}H_{27}O_{14}^-$	551,14063	551,13965	1,78	533(20), 507(100), 489(10), 389(20), 341(30)	489(20), 393(30), 323(40), 179(15), 161(100)	133(100)
77	7,50	Ферулоил 6'-секологанозид	$C_{26}H_{29}O_{14}^-$	565,15628	565,15552	1,34	547(5), 533(10), 521(100), 489(10), 389(15)	489(100), 393(20), 323(20), 193(10), 175(10)	393(80), 323(100), 281(20), 179(30), 161(20)
78	7,61	p-Кумароил 6'-секологанозид	$C_{25}H_{27}O_{13}^-$	535,14571	535,14526	0,84	517(10), 491(100), 389(20), 345(10), 209(5)	325(10), 265(50), 235(30), 205(10), 145(100)	145(5), 117(100)

Резултати *UHPLC/Orbitrap-MS* хемијске анализе указују да је садржај секоиридоидних глукозида (**72**, **73**, **74** и **75**) знатно нижи у ХМЕ него у екстракту који није подвргнут дејству β -глукозидазе (Слика 15). Садржај неких флавоноидних гликозида који припадају кверцетин гликозидима (једињења **17**, **21**, **27** и **29**) и глукозидима лутеолина (**18** и **28**) је такође смањен у ХМЕ (Слика 15). Истовремено садржај агликона кверцетина и лутеолина је повећан у ХМЕ, што указује да комерцијална β -глукозидаза бадема има широк спектар супстрата на које делује.



Слика 15. Садржај специјализованих метаболита у МЕ и ХМЕ *S. erythraea*. Мапа расподеле приказује релативни однос у садржају метаболита из сваке групе појединачно (фенолне киселине, глукозиди флавоноида, флавоноиди, ксантони и секоиридоиди). Вредности су изражене као варирање боја, од зелене (минимална концентрација) до црвене (максимална концентрација), као што је представљено на скали боје. Бројеви анализираних метаболита одговарају нумерацији представљеној у Табели 19.

4.1.2. *UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS* профилисање секоиридоидних глукозида и њихових агликона

У циљу идентификације и квантификације секоиридоидних глукозида и продуката њихове деглукозилације развијена је одговарајућа *UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS* метода. На основу доступних података из литературе о структури СВ, СВМ и ГП добијених на основу *LC/+ESI-MS*, *LC/-ESI-MS*, *UHPLC/Q-TOF-MS* и *LC/HRMS/MS* анализа (*Suryawanshi* и сар., 2006; *Zeng* и сар., 2013; *Han* и сар., 2014; *Padhan* и сар., 2015; *Banjanac* и сар., 2017; *Dorđević* и сар., 2017), електрон-спреј јонизација у позитивном јонизационом режиму показала се као најпогоднија метода за анализу секоиридоидних глукозида, што је такође

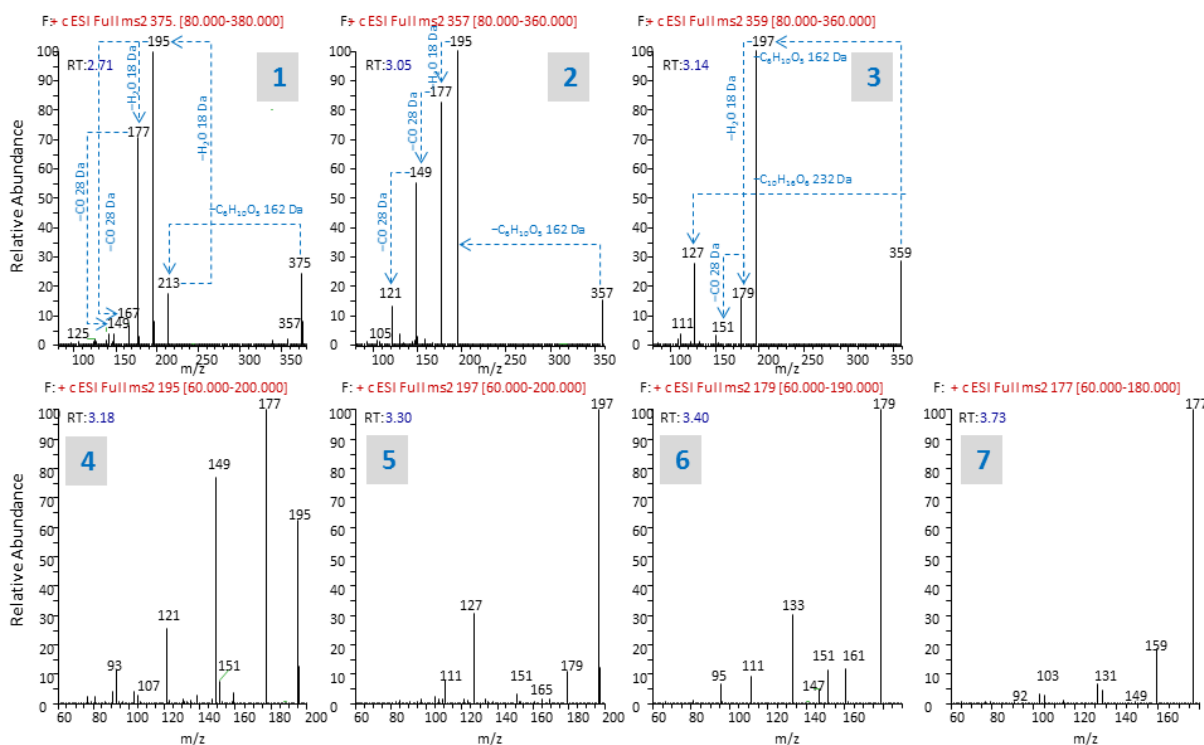
потврђено у овом истраживању. Услед недостатка одговарајућих стандардних једињења идентификација формираних агликона је извршена на основу одговарајућих MS , MS^2 , и UV спектра, ретенционих времена, као и литературних података. Параметри инструменталне методе која је развијена на $UHPLC/DAD/(+/-)HESI-MS/MS$ уређају, укључујући масе псевдомолекуларних јона $[M+H]^+$, MS^2 фрагменте секоиридоидних глукозида и идентификованих агликона, као и DAD податке, приказани су у Табели 20.

Табела 20. Секоиридоидни глукозида и њихови продукти хидролизе идентификовани у метанолним екстрактима *S. erythraea* $UHPLC/DAD/(+)HESI-MS/MS$ анализом. У табели су приказани ретенционо време (t_R), масе (m/z) псевдомолекуларних јона $[M+H]^+$, MS^2 фрагменти, колизионе енергије (cE) и λ_{max} за свако анализирано једињење.

UHPLC-MS подаци				UHPLC-DAD подаци			
Пик број	Име једињења	t_R (min)	$[M+H]^+$ [m/z]	MS^2 фрагменти [m/z (интензитет)]	cE (eV)	t_R (min)	λ_{max} [nm]
1	Сверцијамарин ^{C,1}	2,71	375	213 (15), 195 (100), 177 (70), 167 (10), 149 (5), 147 (< 5), 143 (< 5)	10	2,62	240
2	Генциопикрин ^{C,1}	3,05	357	195 (100), 177 (85), 149 (60), 121 (15)	10	2,95	250, 280, 370
3	Сверозид ^{C,1}	3,14	359	197 (100), 179 (15), 151 (5), 127 (30), 111 (< 5)	10	3,05	250
4	Генциопикрал ¹	3,18	195	195 (65), 177 (100), 151 (5), 149 (75), 121 (25), 107 (5), 93 (10)	10	3,09	230, 270, 350
5	M5 ¹	3,3	197	197 (100), 179 (10), 165 (< 5), 151 (< 5), 127 (35), 111 (5)	10	3,2	250
6	M6 ¹	3,4	179	179 (100), 161 (10), 151 (10), 147 (5), 133 (30), 111 (10), 95 (5)	10	3,54	260
7	Еритроцентаурин ¹	3,73	177	177 (100), 159 (20), 149 (< 5), 131 (10), 103 (< 5), 92 (< 5)	10	3,63	230, 250, 300

^CПотврђено стандардима, ¹Потврђено на основу литературних података. MS^2 фргменти обележени црвеном бојом, коришћени су у SRM експерименту за квантификацију једињења.

СВМ је детектован као пик на ретенционом времену $t_R = 2,71$ min са молекуларним јоном $[M+H]^+$ на 375 m/z . Јон агликона СВМ $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$ забележен је на 213 m/z , дехидратисани јон агликона $[M+H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^+$ на 195 m/z и ди-дехидратисани јон $[M-C_6H_{10}O_5-2H_2O+H]^+$ на 177 m/z (Слика 16). Присуство јона $[M-C_6H_{10}O_5-H_2O-CO]^-$ на 167 m/z који настаје губитком CO са јона на 195 m/z и јона $[M-C_6H_{10}O_5-2H_2O-CO]^-$ на 149 m/z који настаје губитком CO са јона на 177 m/z додатна су потврда да је описано једињење СВМ. Дијагностички MS^2 фрагменти СВМ зебележени су на 179 m/z и 147 m/z . Пик СВМ је на $UHPLC/DAD$ хроматограму уочљив на ретенционом времену $t_R = 2,61$ min са $\lambda_{max} = 240$ nm (Слика 16). Пик ГП који се одликује псевдомолекуларним јоном $[M+H]^+$ на 357 m/z појављује се као пик на ретенционом времену $t_R = 3,05$ min. MS^2 фрагмент $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$ на 195 m/z одговара агликону, а јон $[M+H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^+$ на 177 m/z настаје губитком молекула воде са агликона (Слика 16). Јон $[M+H-C_6H_{10}O_5-H_2O-CO]^-$ на 149 m/z настаје након губитка CO са јона на 177 m/z , а јон $[M+H-C_6H_{10}O_5-H_2O-2CO]^-$ на 121 m/z настаје након губитка молекула воде и 2 CO јединице са агликона на 195 m/z . ГП је квантификован у SRM експерименту на основу MS^2 дијагностичких фрагмената на 177 m/z и 121 m/z . На $UHPLC/DAD$ хроматограму ГП показује пик на ретенционом времену $t_R = 2,95$ min са $\lambda_{max} = 250, 280$ и 370 nm (Слика 16).



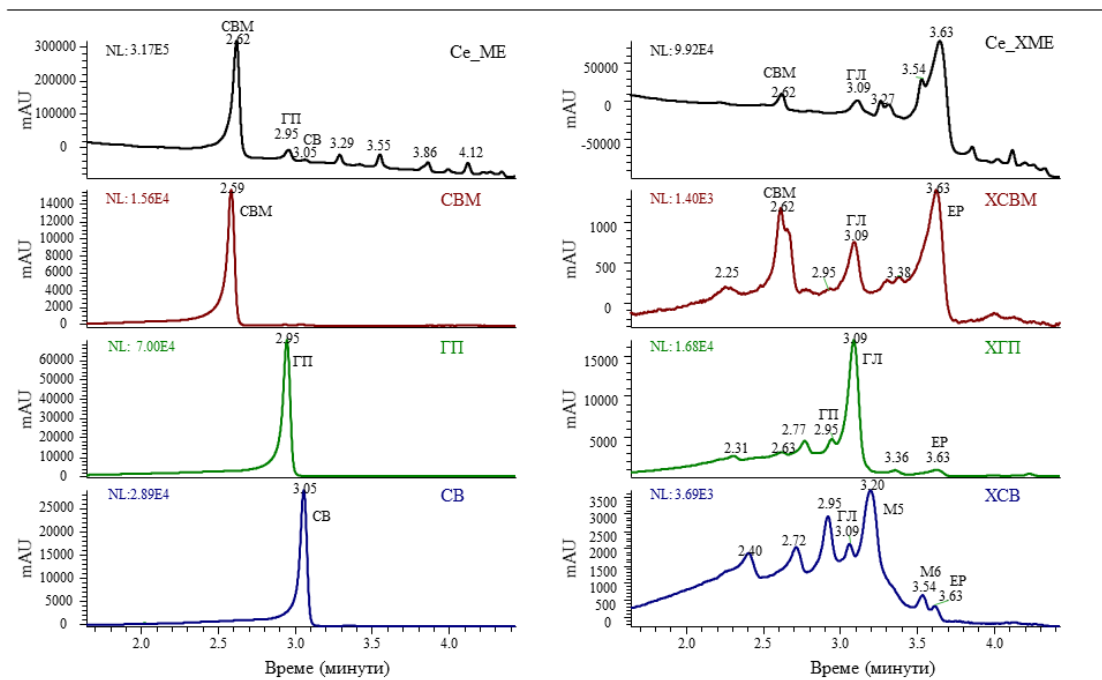
Слика 16. *UHPLC/(+)HESI-MS/MS* фрагментациони профили секоиридоидних глукозида и одговарајућих агликона у МЕ и ХМЕ *C. erythraea*. MS^2 спектри: 1. сверцијамарин, 2. генциопикрин, 3. сверозид, 4. генциопикрал, 5. метаболит *M5*, 6. метаболит *M6*, 7. еритроцентаурин. Претпостављени путеви фрагментације обележени су испрекиданом плавом линијом.

Јон $[M+H]^+$ на $359\ m/z$ одговара СВ, а главни MS^2 производ јон $[M+H-C_6H_{12}O_5]^+$ на $197\ m/z$ настаје губитком глукозе. Јон $[M+H-C_6H_{12}O_5-H_2O]^+$ на $179\ m/z$ настаје након губитка молекула воде са агликона (Слика 16). Губитком CO са фрагмента $179\ m/z$ настаје јон $[M+H-C_6H_{12}O_5-H_2O-CO]^+$ на $151\ m/z$. Вероватно долази до раздвајања прстена преко такозване *retro-Diels-Alder (RDA)* реакције, што је праћено цепањем $C1-O$ и $C5-C9$ веза, након чега настаје јон $[M+H-RDA\ fragment]^+$ на $127\ m/z$ услед губитка $232\ Da$. СВ је видљив на *UHPLC/DAD* хроматограму на ретенционом времену $t_R = 3.05\ min$ са $\lambda_{max} = 250\ nm$.

UHPLC/DAD анализом хидролизованог стандарда СВМ потврђено је присуство два нова пика на $t_R = 3,09\ min$ и $t_R = 3,63\ min$ који одговарају генциопикралу (ГЛ) и еритроцентаурину (ЕР) (Слика 16). *UHPLC/(+)HESI-MS/MS* анализа је показала јон $[M+H]^+$ на $195\ m/z$ који одговара ГЛ и јон $[M+H]^+$ на $177\ m/z$ који одговара ЕР. Генциопикрал је агликон СВМ са јоном који настаје услед губитка молекула воде $[M+H-H_2O]^+$ на $177\ m/z$ и јоном $[M+H-H_2O-CO]^+$ на $149\ m/z$ који настаје након губитка молекула воде и CO јединице (Слика 16). Након губитка још једне CO јединице настаје јон $[M+H-H_2O-2CO]^+$ на $121\ m/z$. Молекуларни јон ЕР $[M+H]^+$ на $177\ m/z$ показује MS^2 јоне $[M+H-H_2O]^+$ на $159\ m/z$, $[M+H-CO]^+$ на $149\ m/z$ и $[M+H-H_2O-CO]^+$ на $131\ m/z$. Исти производи забележени су након ензиматске хидролизе ГП комерцијалном β -глукозидазом, при чему настаје више ГЛ него ЕР (Слика 16). Након ензиматске хидролизе СВ појављују се нови пикови видљиви на *UHPLC/DAD* хроматограмима на ретенционим временима $t_R = 3,20$ и $t_R = 3,53\ min$ која одговарају једињењима *M5* и *M6*. Једињење *M5* $[M+H]^+$ на $197\ m/z$ показује јоне $[M+H-H_2O]^+$ на $179\ m/z$, и $[M+H-CO]^+$ на $151\ m/z$. Јон $[M+H-RDA\ fragment]^+$ на $127\ m/z$ највероватније настаје путем фисије прстена посредством *RDA* реакције, што је праћено

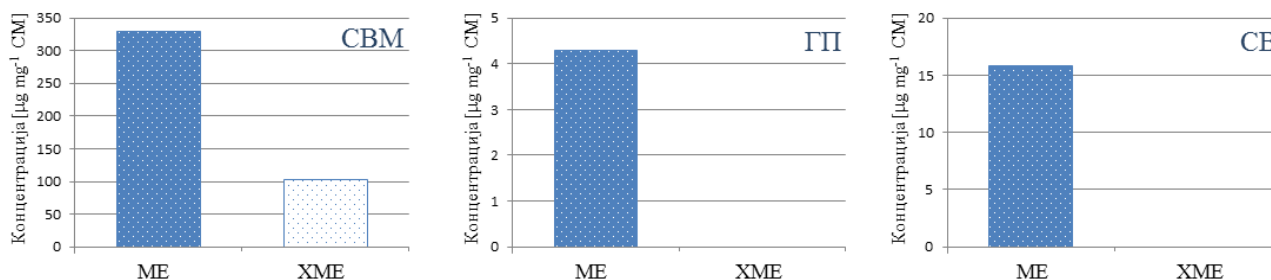
раскидањем C1-O и C5-C9 веза. Једињење M6 $[M+H]^+$ на 179 m/z показује јоне $[M+H-H_2O]^+$ на 161 m/z , и $[M+H-CO]^+$ на 151 m/z и $[M+H-H_2O-CO]^+$ на 133 m/z (Слика 16).

Доминантни секоиридоидни глукозиди присутни у екстрактима *C. erythraea*, СВ, СВМ и ГП, су такође хидролизоване након инкубације са ензимом β -глукозидазом. *UHPLC/DAD* хроматограми ХМЕ слични су хроматограмима хидролизованог СВМ (Слика 17).



Слика 17. *UHPLC-DAD* хроматограми МЕ и ХМЕ *C. erythraea* и стандардних једињења. Скраћенице: СВМ, сверцијамарин; ГП, генциопикрин; СВ, сверозид; ХСВМ, хидролизоване сверцијамарин; ХГП, хидролизоване генциопикрин; ХСВ, хидролизоване сверозид.

Квантификација доминантних секоиридоида у МЕ *C. erythraea* показала је да су у узорку најзаступљенији секоиридоиди СВМ, у концентрацији од 329 $\mu\text{g mg}^{-1}$, СВ са 15 $\mu\text{g mg}^{-1}$ и ГП у концентрацији од 4 $\mu\text{g mg}^{-1}$ суве масе екстракта (Слика 18).



Слика 18. Садржај секоиридоидних глукозида у МЕ и ХМЕ *C. erythraea* (СВМ - сверцијамарин, ГП - генциопикрин и СВ - сверозид).

У ХМЕ кичице квантификован је само СВМ у концентрацији од 103 $\mu\text{g mg}^{-1}$. Резултати *UHPLC/DAD*/(+)*HESI-MS*² анализе ХМЕ и МЕ екстракта *C. erythraea* су показали да након ензиматске хидролизе екстракта кичице долази до смањења концентрације СВМ у узорку за

69%, као и до потпуне деградације СВ и ГП (100%) (Слика 18). Хидролиза стандардних једињења под истим условима довела је до смањења количине СВМ за 95%, ГП за 94% и СВ за 99% (резултати нису приказани).

4.1.3. Промена биолошке активности екстракта кичице као последица њихове хидролизе

Измењен хемијски састав екстракта кичице који је последица хидролизе посредством β -глукозидаза усмерио је део истраживања ка анализи антиоксидативног и антимикробног дејства МЕ и ХМЕ, као и главних секоиридоидних компоненти.

4.1.3.1. Антиоксидативна активност екстраката *C. erythraea* и секоиридоидних глукозида

Антиоксидативна активност ХМЕ и МЕ метанолних екстраката *C. erythraea*, као и стандарда СВ, СВМ и ГП, одређена је применом три различите методе: анализа способности неутрализације *DPPH* радикала, неутрализација *ABTS* радикала и одређивање редукционе способности јона гвожђа (*FRAP*).

У Табели 21 приказане су вредности антиоксидативног капацитета испитиваних узорака. Нису забележене разлике у антиоксидативној активности између МЕ и ХМЕ кичице када је активност мерена *DPPH* и *FRAP* тестом. Разлике у активности нису забележене ни између хидролизованых и нехидролизованых чистих секоиридоида поређењем резултата *DPPH* и *FRAP* теста. Забележена је већа антиоксидативна активност ХМЕ у односу на МЕ када су узорци тестирани *ABTS* методом. Слично су се понашали и хидролизованых секоиридоиди у поређењу са нехидролованим секоиридоидима приликом коришћења истог теста. Резултати су показали да МЕ и ХМЕ имају бољу антиоксидативну активност од сва три тестирана секоиридоида. Хидролизованых генциопикрин (ХГП) је имао приближне антиоксидативне вредности као МЕ у *ABTS* тесту.

Табела 21. Антиоксидативна активност ХМЕ и МЕ *C. erythraea* и стандардних раствора секоиридоидних глукозида. Вредности су изражене као *mmol* еквивалента антиоксидативног капацитета галне киселине на 100 *mg* сувог екстракта (*mmol GAE 100 mg⁻¹ CE*). Вредности обележене истим словима, не показују статистички значајну разлику ($p \leq 0,05$) према *Fisher LSD* тесту.

	<i>mmol GAE 100 mg⁻¹ CE</i>		
Антиоксидативни тест	<i>ABTS</i>	<i>DPPH</i>	<i>FRAP</i>
<i>C. erythraea</i> (МЕ)	94,783 ^{ab}	46,812 ^a	127,087 ^a
<i>C. erythraea</i> (ХМЕ)	115,665 ^a	59,432 ^a	134,688 ^a
Сверозид (СВ)	8,743 ^d	0,742 ^b	0,426 ^b
Сверозид (ХСВ)	52,191 ^c	0,818 ^b	0,828 ^b
Сверцијамарин (СВМ)	10,204 ^d	0,757 ^b	0,416 ^b
Сверцијамарин (ХСВМ)	56,102 ^c	0,811 ^b	0,711 ^b
Генциопикрин (ГП)	7,539 ^d	0,947 ^b	0,450 ^b
Генциопикрин (ХГП)	77,530 ^{bc}	0,739 ^b	1,188 ^b

Скраћенице: МЕ-метанолни екстракт кичице, ХМЕ-хидроловани метанолни екстракт кичице, СВ-сверозид, ХСВ-хидроловани сверозид, СВМ-сверцијамарин, ХСВМ-хидроловани сверцијамарин, ГП-генциопикрин, ХГП-хидроловани генциопикрин.

У циљу процене поузданости и степена корелације између вредности антиоксидативног потенцијала узорака кичице које су добијене применом различитих тестова спроведена је корелациона анализа, а коефицијент корелације (R) и коефицијент детерминације (R^2) су дати у Табели 22. Све R вредности су имале статистичку значајност ($p < 0,05$), при чему је највећа корелација показана између $DPPH$ и $FRAP$ теста ($R = 0,995$).

Табела 22. Корелација (R и R^2) између вредности антиоксидативног капацитета узорака кичице добијених на основу три различита теста. Ниво значајности $p < 0.05$.

	R (R^2)
$DPPH/ABTS$	0,787* (0,619)
$ABTS/FRAP$	0,783* (0,613)
$DPPH/FRAP$	0,995* (0,989)

Скраћенице: *-статистички значајне корелације ($p < 0.05$).

4.1.3.2. Антимикробна активност екстракта *C. erythraea* и секоиридоидних глукозида

Антимикробно дејство ХМЕ и МЕ *C. erythraea* и стандарда секоиридоидних гликозида (СВ, СВМ и ГП) тестирано је на четири Грам-позитивне и четири Грам-негативне врсте бактерија, као и на осам врста микромицета. Концентрација екстракта или стандардног једињења која инхибира раст микроорганизама означена је као минимална инхибиторна концентрација (*eng. minimal inhibitory concentration- MIC*). Минимална бактерицидна/фунгицидна концентрација (*eng minimal bactericidal concentrations/minimal fungicidal concentration- MBC/MFC*) представља концентрацију биљног екстракта или стандардног једињења при којој није забележен раст бактерије/гљиве.

Екстракти *C. erythraea* (МЕ и ХМЕ) су показали сличну или јачу антимикробну активност на тестиране бактерије и микрогљиве у поређењу са комерцијалним антибиотицима и антимикотицима. Антимикробна активност секоиридоидних глукозида СВ и СВМ је значајно већа у односу на комерцијалне антибиотике стрептомицин и ампицилин (Табела 23).

Минимална инхибиторна концентрација МЕ (MIC) је варијала од 0,125 до 0,300 $mg\ ml^{-1}$, док је минимална бактерицидна концентрација (MBC) била у опсегу од 0,250 до 0,450 $mg\ ml^{-1}$. MIC вредност ХМЕ екстракта се кретала у опсегу од 0,125 до 0,375 $mg\ ml^{-1}$, а MBC у опсегу од 0,250 до 0,450 $mg\ ml^{-1}$. МЕ кичице је показао ефикасније дејство против бактеријских сојева *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *M. flavus* и *E. coli* у поређењу са ХМЕ. Уочено је и слабије дејство ХМЕ кичице на све тестиране бактеријске сојеве у поређењу са комерцијалним антибиотицима стрептомицином и ампицилином, док је МЕ кичице показао снажније дејство према *S. aureus* и *L. monocytogenes* у поређењу са антибиотиком стрептомицином.

MIC вредности стандардних раствора секоиридоида су варијале од 0,004 до 0,030 $mg\ ml^{-1}$, док су вредности MBC биле у опсегу од 0,007 до 0,060 $mg\ ml^{-1}$. СВМ и СВ, као и њихове хидролизоване форме имале су изражен антибактеријски ефекат против свих тестираних бактеријских сојева који је био јачи и у односу на комерцијалне антибиотике.

Табела 23. Антимикробна активност МЕ и ХМЕ *C. erythraea* и чистих секоиридоидних глукозида: А) Антибактеријска активност, Б) Антифунгална активност.

А.								
	<i>MIC/MBC [mg ml⁻¹]</i>							
Бактерија	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>M. flavus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>C. erythraea</i> (МЕ)	0,187/0,250	0,125/0,250	0,125/0,250	0,250/0,450	0,125/0,250	0,300/0,350	0,125/0,250	0,125/0,250
<i>C. erythraea</i> (ХМЕ)	0,250/0,300	0,125/0,250	0,187/0,250	0,375/0,450	0,125/0,250	0,375/0,450	0,125/0,300	0,125/0,250
Сверозид (СВ)	0,007/0,015	0,004/0,015	0,022/0,030	0,011/0,015	0,030/0,030	0,015/0,030	0,007/0,015	0,007/0,015
Сверозид (ХСВ)	0,004/0,015	0,007/0,015	0,015/0,030	0,007/0,015	0,015/0,030	0,007/0,015	0,007/0,015	0,007/0,015
Сверцијамарин (СВМ)	0,004/0,007	0,004/0,015	0,022/0,030	0,011/0,015	0,030/0,060	0,011/0,015	0,007/0,015	0,007/0,015
Сверцијамарин (ХСВМ)	0,006/0,015	0,007/0,015	0,075/0,015	0,011/0,015	0,015/0,030	0,011/0,015	0,007/0,015	0,007/0,015
Стрептомицин	0,250/0,500	0,050/0,100	0,150/0,300	0,130/0,250	0,050/0,100	0,050/0,100	0,050/0,100	0,050/0,100
Ампицилин	0,100/0,150	0,100/0,150	0,150/0,300	0,100/0,150	0,100/0,200	0,300/0,50	0,150/0,200	0,150/0,200
Б.								
	<i>MIC/MFC [mg ml⁻¹]</i>							
Гљива	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. viride</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>P. ochrochloron</i>	<i>P. verucosum</i>
<i>C. erythraea</i> (МЕ)	0,125/0,250	0,125/0,250	0,125/0,250	0,250/0,300	0,125/0,250	0,062/0,250	0,062/0,250	0,062/0,250
<i>C. erythraea</i> (ХМЕ)	0,125/0,250	0,125/0,250	0,300/0,400	0,250/0,300	0,125/0,250	0,062/0,250	0,062/0,250	0,062/0,250
Сверозид (СВ)	0,015/0,060	0,007/0,015	0,004/0,007	0,004/0,007	0,001/0,002	0,004/0,007	0,004/0,007	0,030/0,060
Сверозид (ХСВ)	0,030/0,060	0,004/0,007	0,004/0,007	0,004/0,007	0,003/0,006	0,002/0,004	0,002/0,004	0,007/0,015
Сверцијамарин (СВМ)	0,004/0,015	0,004/0,007	0,004/0,007	0,004/0,007	0,002/0,004	0,004/0,007	0,002/0,004	0,004/0,015
Сверцијамарин (ХСВМ)	0,007/0,060	0,007/0,015	0,004/0,007	0,007/0,015	0,002/0,004	0,004/0,007	0,004/0,007	0,007/0,015
Кетоконазол	0,200/0,500	0,200/0,500	0,150/0,200	0,200/0,500	0,200/0,300	0,250/0,350	0,200/0,500	1,000/1,000
Бифоназол	0,150/0,200	0,100/0,200	0,150/0,200	0,150/0,200	0,100/0,200	0,200/0,250	0,200/0,250	0,150/0,200

Хидролизоване сверициди (ХСВ) је показао нижу *MIC* вредност у поређењу са нехидролизованом обликом у случају бактеријских сојева *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *M. flavus*, *P. aeruginosa* и *E. coli*. СВМ је такође био ефикаснији од своје хидролизоване форме против свих тестираних Грам-позитивних бактеријских сојева, са изузетком *M. flavus*. Са друге стране, хидролизоване сверицијамарин (ХСВМ) је био ефикаснији против Грам-негативне бактерије *P. aeruginosa* него одговарајући нехидролизоване облици једињења. СВ и СВМ су показали сличну антибактеријску активност осим у односу на бактеријске сојеве *S. aureus* и *E. coli* где је већу ефикасност имао СВМ. ХСВ је показао јачу антибактеријску активност него хидролизоване сверицијамарин, и то на бактеријским врстама *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *M. flavus*, и *E. coli*. Обе форме сверициди и сверицијамарина имале су јачи антибактеријски ефекат него тестирани антибиотици.

ХМЕ и МЕ *C. erythraea* су у зависности од врсте гљиве показали антифунгалну активност са *MIC* вредностима између 0,062 и 0,300 $mg\ ml^{-1}$ и вредностима минималне фунгицидне концентрације (*MFC*) у опсегу од 0,250 до 0,400 $mg\ ml^{-1}$. Значајне разлике између екстраката нису уочене осим у случају дејства на *A. ochraceus* према коме је МЕ кичице испољио јачи ефекат. Анализирани МЕ и ХМЕ екстракти *C. erythraea* су показали јачи антифунгални ефекат на сојеве *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *T. viride*, *P. funiculosum*, *P. ochrochloron* и *P. verrucosum var. cyclopium* у поређењу са комерцијалним антимицотицима кетоконазолом и бифоназолом.

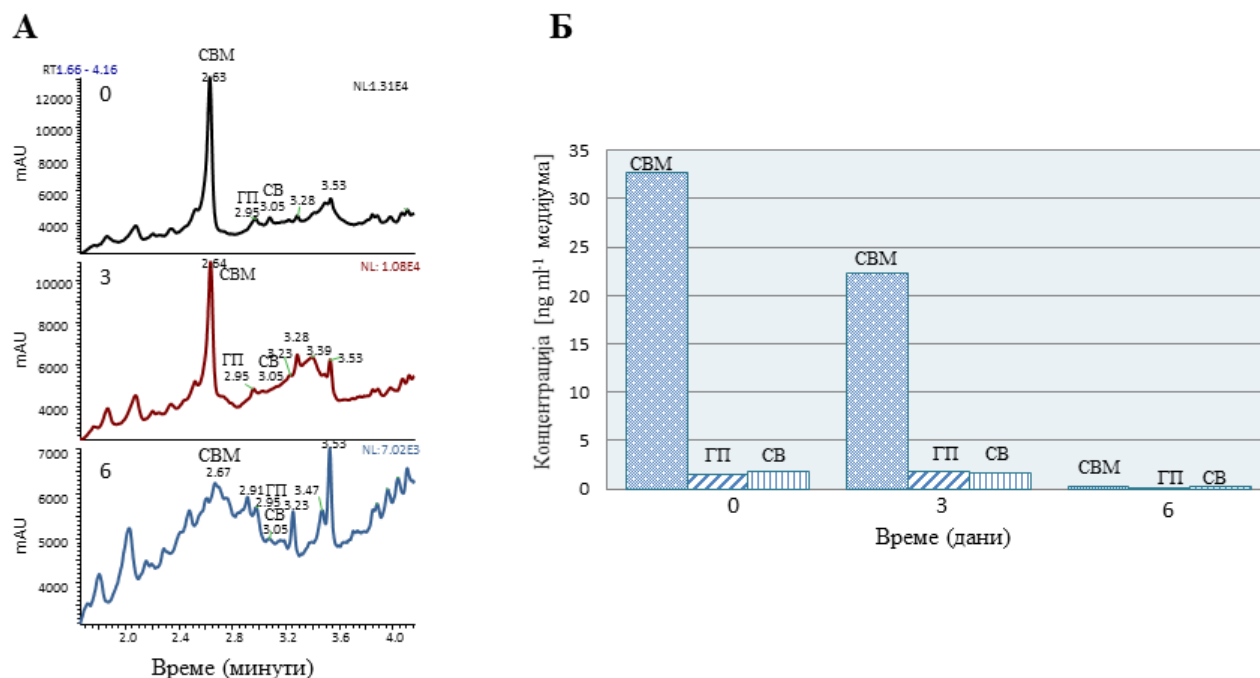
Стандарди секоиридоида су показали јачу антифунгалну активност од екстраката *C. erythraea* са *MIC* вредностима које су се кретале између 0,007 и 0,030 $mg\ ml^{-1}$ и *MFC* вредностима у опсегу од 0,002 до 0,060 $mg\ ml^{-1}$. ХСВ био је ефикаснији против сојева *A. versicolor*, *P. funiculosum*, *P. ochrochloron* и *P. verrucosum var. cyclopium* у поређењу са нехидролизованом формом СВ. Са друге стране, СВ је показао јаче инхибиторно дејство на *T. viride* и *A. fumigatus* од своје хидролизоване форме. СВМ је био ефикаснији против врста *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *A. niger*, *P. ochrochloron* и *P. verrucosum var. cyclopium* како од своје хидролизоване форме (ХСВМ), тако и у поређењу са СВ. Са друге стране, СВ испољава јаче антифунгално дејство од СВМ у сузбијању раста *T. viride*. ХСВ поседује јаче антифунгално дејство од хидролизованог облика сверицијамарина (ХСВМ) према врстама *A. versicolor*, *A. niger*, *P. funiculosum* и *P. ochrochloron*. Насупрот томе, хидролизоване форма сверицијамарина (ХСВМ) показала је јаче антифунгално дејство на *A. fumigatus* и *T. viride* од ХСВ. Најјаче антифунгално дејство тестирани стандарди секоиридоида су испољили на врстама *A. ochraceus*, *T. viride*, *P. funiculosum* и *P. ochrochloron*. Сви тестирани узорци, како екстракти *C. erythraea*, тако и одговарајући стандарди секоиридоида, било да су ензиматски хидролизоване или не, показали су снажно антифунгално дејство слично или јаче од оба тестирана антимицотика кетоконазола и бифоназола.

4.1.3.3. *In vivo* биотрансформација метанолних екстраката *C. erythraea* посредством гљиве *P. funiculosum*

Експерименти биотрансформације МЕ кичице изведени су да би се испитала могућност да сојеви бактерија и микромицета који су коришћени у антимицробним тестовима могу да трансформишу сублеталне концентрације секоиридоида (СВМ, ГП и СВ) присутних у хранљивој подлози уз помоћ сопствених екстрацелуларних β -глукозидаза. За експерименте је одабран фунгални сој *P. funiculosum* према коме су и МЕ и ХМЕ кичице испољили снажно антифунгално дејство (Табела 23), а који је у литератури познат по продукцији екстрацелуларних β -глукозидаза (*Lachke* и сар., 1983; *Kantham*, 1985; *De Castro* и сар., 2010).

Инкубација течне културе гљиве са сублеталним концентрацијама екстраката *C. erythraea* довела је до постепеног смањења концентрације секоиридоидних глукозида СВ,

СВМ и ГП у подлози. Мерења садржаја секоиридоидних глукозида вршена су на почетку кокултивације (0 дана), као и након 3 и 6 дана култивације (Слика 19). Шест дана након инкубације културе *P. funiculosum* са екстрактом *C. erythraea* количина мерених секоиридоида је значајно опала (Слика 19 Б).



Слика 19. Биотрансформација секоиридоидних гликозида из екстракта *C. erythraea* под дејством гљиве *P. funiculosum*. А. UHPLC-DAD хроматограми културе *P. funiculosum* са 5 mg екстракта *C. erythraea*. Б. Садржај секоиридоида сверцијамарина (СМ), генциопикрина (ГП) и сверозида (СВ) у култури *P. funiculosum* након 0, 3 и 6 дана кокултивације.

Продукти хидролизе секоиридоидних глукозида нису детектовани у условима *in vivo*. Имајући у виду да агликони који настају у катаболичком процесу могу да се конвертују у одговарајуће алкоhole и диалдехиде, претпоставља се да су њихове концентрације у датим условима биле испод нивоа детекције коришћене аналитичке методе (Слика 19 А). Резултати су указали да фунгални сој *P. funiculosum* може да расте у присуству екстракта кичице који је богат секоиридоидима, при чему се концентрација ових једињења у подлози постепено смањује (Слика 19 Б). На овај начин *P. funiculosum* ефикасно превазилази токсични ефекат секоиридоида и њихових агликона.

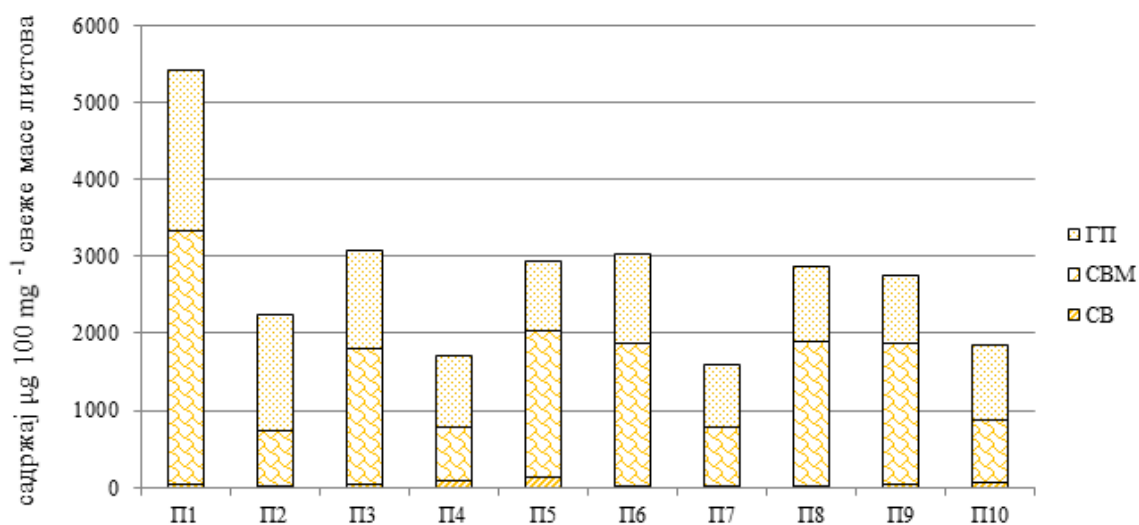
4.2. Метаболизам секоиридоидних глукозида у листовима *C. erythraea* током одговора на стрес механичким повређивањем

У циљу анализе утицаја механичког повређивања листова на метаболизам секоиридоидних глукозида у листовима кичице (*C. erythraea*) извршено је упоредно профилисање ове групе једињења и анализа експресије биосинтетских гена у узорцима интактних и повређених листова који су сакупљани у различитим временским интервалима након повреде. Сви експерименти су урађени коришћењем клонално пропагираних јединки

одабраног високопродуктивног генотипа кичице као би се избегао ефекат генотипа на фенотипску варијабилност. Анализиран је такође ниво експресије гена који кодирају за одабране транскрипционе факторе као би се стекао увид у механизме регулације биосинтетског пута секоиридоида и расветлила улога сигналног пута *JA* током одбрамбеног одговора биљке на стрес повређивањем. Од посебне важности било је праћење експресије гена који кодирају за ензим β -глукозидазу (*CeBGLU*), ензима који катализује почетни корак катаболизма секоиридоидних глукозида, у експерименталном моделу механичког повређивања листова.

4.2.1. Селекција високопродуктивног генотипа *C. erythraea* и његова клонална пропација

Садржај секоиридоида у насумично одабраних десет индивидуа, које су одгајене из семена сакупљених на локалитету Паља (Србија), приказан је на Слици 20. Јединка са укупним садржајем секоиридоида - означена као П1 (5420 μg секоиридоида 100 mg^{-1} свежје масе) одабрана је за клонално умножавање посредством *in vitro* културе коренова. Изданци регенерисани на кореновима пребачени су на чврсту $\frac{1}{2}$ *MS* хранљиву подлогу ради индукције ожиљавања, након чега су коришћени у експериментима за испитивање утицаја механичког повређивања ткива и третмана *MeJA* на продукцију секоиридоидних глукозида код кичице (Слика 20).



Слика 20. Укупни садржај секоиридоидних глукозида у листовима 10 одабраних јединки (П1-П10) пореклом из популације Паља (Србија). Скраћенице: ГП- генциопикрин, СВМ- сверциамарин, СВ- сверозид.

4.2.2. Профилисање иридоида и секоиридоида у листовима кичице након механички изазваног повређивања

За квантификацију иридоида (ЛК и ЛОГ) и секоиридоида (СЛОГ, СВ, СВМ и ГП) у П1 јединкама *C. erythraea* коришћена је *UHPLC/DAD/(-)HESI-MS²* анализа (Табела 24). Молекуларни јони свих мерених једињења, анализирани у негативном јонизационом режиму видљиви су као адукти са сирћетном киселином $[M+CH_3COOH-H]^-$, са изузетком ЛК.

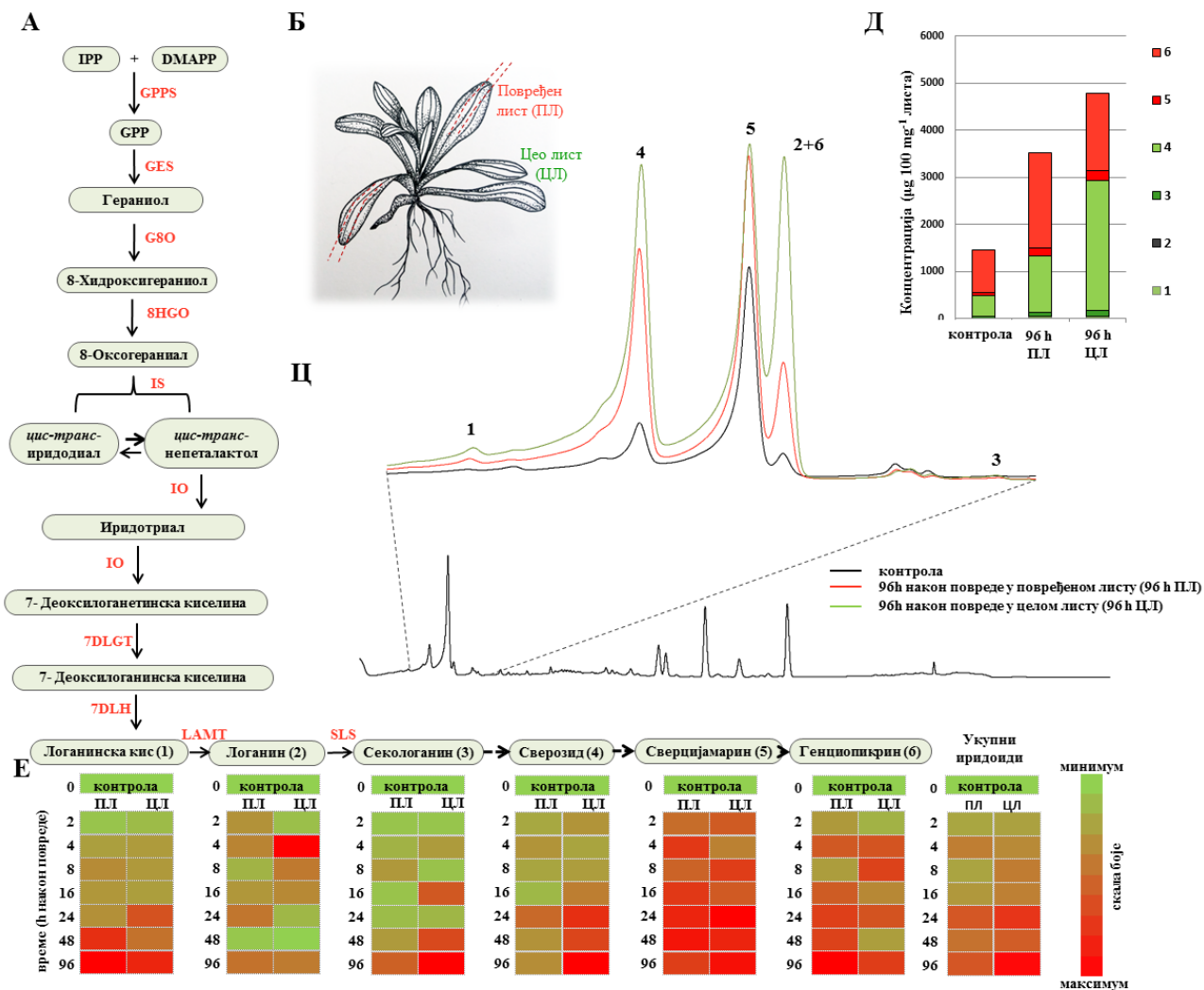
Табела 24. Иридоиди и секоиридоиди идентификовани у метанолним екстрактима П1 генотипа врсте *C. erythraea* применом UHPLC/DAD/(-)HESI-MS² анализе. Приказани су следећи параметри: ретенционо време (t_R), продукт јони $[M+CH_3COOH-H]^-$ m/z , MS² фрагментата коришћених у SRM (енг. *Single Reaction Monitoring*) експерименту, колизионе енергије (cE), и λ_{max} за свако анализирано једињење.

UHPLC-MS подаци					UHPLC-DAD подаци		
Пик број	Име једињења	t_R (min)	$[M+CH_3COOH-H]^-$ m/z	SRM MS ² фрагменти $[m/z$ (интензитет)]	cE (eV)	t_R (min)	λ_{max} [nm]
1	Логанинска киселина ^{C,1}	2,01	375	213 (100), 168 (<5)	20	1,95	240
5	Сверцијамарин ^{C,1}	2,61	433	179 (100); 161 (15)	20	2,52	240
2	Логанин ^{C,1}	2,88	449	227 (85); 127 (100)	30	2,85	240
6	Генциопикрин ^{C,1}	2,9	415	179 (60); 119 (100)	20	2,83	250, 280, 370
4	Сверозид ^{C,1}	3	417	195 (100); 179 (85)	20	2,94	250
3	Секологанин ^{C,1}	3,66	447	155 (100); 123 (30)	30	3,58	240

^CПотврђени коришћењем стандарда, ¹Потврђени на основу литературних података

ЛК је показала јон $[M-H]^-$ на 375 m/z и MS² фрагменте $[M-C_6H_{10}O_5-CH_2O-H]^-$ на 168 m/z и $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ на 213 m/z што одговара губитку хексозе од 162 Da. Псеудомолекуларни јон ЛОГ $[M+CH_3COOH-H]^-$ детектован је на 449 m/z , а након губитка глукозе показује MS² јон $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ на 227 m/z . СЛОГ са псеудомолекуларним јоном $[M+CH_3COOH-H]^-$ на 447 m/z показује фрагменте $[M-C_6H_{10}O_5-H_2O-CO-24-H]^-$ на 155 m/z и $[M-C_6H_{10}O_5-H_2O-CO-C_2O_2-H]^-$ на 123 m/z . Јон СВ $[M+CH_3COOH-H]^-$ на 417 m/z даје MS² продукт јон $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ на 195 m/z , који настаје услед губитка глукозе $[C_6H_{12}O_6-H_2O-H]^-$ од 161 m/z . СВМ показује јон $[M+CH_3COOH-H]^-$ на 433 m/z са дијагностичким MS² фрагментом $[C_6H_{12}O_6-H]^-$ на 179 m/z који одговара депротонованој глукози и фрагментом $[M-C_7H_{12}O_8-H]^-$ на 149 m/z који је настао услед губитка глукозе, H₂O и CO₂. Јон ГП $[M+CH_3COOH-H]^-$ на 415 m/z показује MS² фрагменте $[C_6H_{12}O_6-H]^-$ на 179 m/z који одговара депротонованој глукози, и $[M-H-C_8H_{12}O_8]^-$ јон на 119 m/z , који је настао након губитка глукозе, H₂O и CO₂. UHPLC/DAD подаци су представљени у Табели 24, док су хроматограми повређених и целих листова дати на Слици 21 Ц.

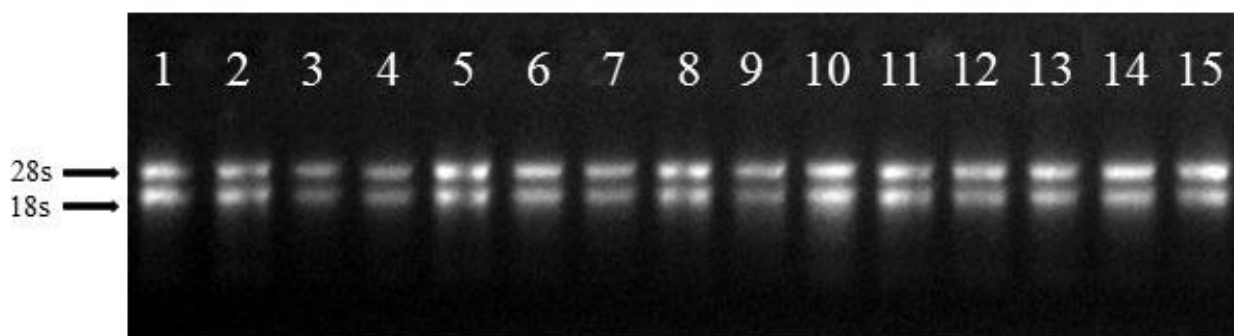
Хемијско профилисање иридоида и секоиридоида у листовима кичице, показало је да механичко повређивање ткива листова изазива промене у садржају ових једињења, како у целим, тако и у повређеним листовима (Слика 21 Е). Акумулација СВМ и ГП у листовима детектована је већ 2 h након повређивања, док количина СЕК и СВ значајно расте након 16 h. Садржај СВМ у листовима достиже максималне вредности 24 h касније. Садржај СЕК, СВ и ГП достиже максималне вредности 96 h након повреде. Укупни садржај анализираних специјализованих метаболита расте до 96 h након повређивања и у целим и у повређеним листовима. Тада су забележене максималне вредности садржаја укупних иридоида и секоиридоида и то у целим листовима (Слика 21 Е, 21 Ц). Најзаступљенији секоиридоид је био СВ у концентрацији 2700 μg 100 mg^{-1} свеже масе листова. ГП је акумулиран у листовима до 2000 μg 100 mg^{-1} , а СВМ до 200 μg 100 mg^{-1} свеже масе листова. Концентрација ЛК је достигла вредности до 50 μg на 100 mg , а ЛОГ до 3 μg на 100 mg свеже масе листова (Слика 21 Д).



Слика 21. Ефекат стреса повређивањем на садржај иридоида и секоиридоида у листовима *C. erythraea*. А. Хипотетичка схема биосинтетског пута секоиридоидних глукозида код врсте *C. erythraea* (модификовано према *Matekalo* и сарадницима, (2018)). Познати ензими су обележени стрелицама, док је испрекиданим стрелицама обележен део пута у ком ензими до данас нису познати. Б. Графички приказ поступка повређивања листова: повређени листови (ПЛ), цели листови (ЦЛ). В. *UHPLC/DAD* хроматограм неповређеног листа са почетка експеримента. Увећан је део са пиковима који одговарају иридоидима и секоиридоидима. Д. Укупни садржај иридоида у контроли, повређеним и целим листовима 96 h након повређивања. Скраћенице: 1-логанинска киселина, 2-логанин, 3-секологанин, 4-сверозид, 5-сверцијамарин, 6-генциопикрин. Е. Топлотне мапе (енг. *heat maps*) приказују садржај сваког метаболита у различитим временским тачкама након механичког повређивања у ПЛ и ЦЛ. Вредности су представљене на скали од зелене (минимална концентрација) до црвене (максимална концентрација) за свако једињење посебно, као и за укупни садржај иридоида у листовима. Скраћенице: *IPP* изопентенил пирофосфат, *DMAPP* диметилаллил пирофосфат, *GPP* геранил дифосфат, *GPPS* геранил дифосфат синтаза, *GES* гераниол синтаза, *G8O* гераниол 8-оксидаза, *8HGO* 8-хидроксигераниол оксидоредуктаза, *IS* иридоид синтаза, *IO* иридоид оксидаза, *7DLGT* глукозил трансфераза 7-деоксилоганетинске киселине, *7DLH* хидроксилаза 7-деоксилоганинске киселине, *LAMT* О-метилтрансфераза логанинске киселине, *SLS* секологанин синтаза.

4.2.3. Анализа експресије биосинтетских гена и гена за транскрипционе факторе укључених у метаболизам секоиридоида код *C. erythraea*

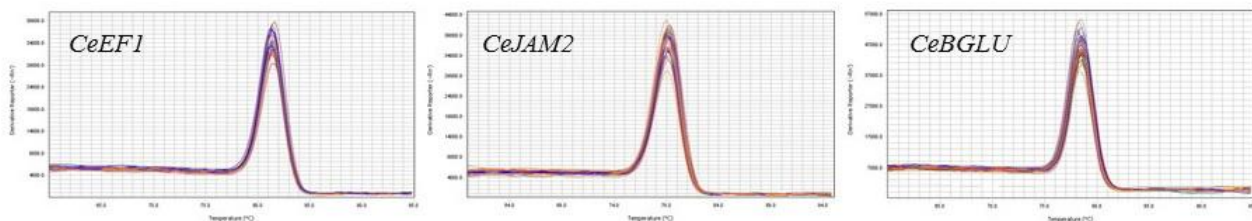
Применом *qPCR* методе одређен је ниво експресије биосинтетских гена у повређеним и целим листовима кичице који су узорковани у различитим временским интервалима након повређивања. Најпре је из биљног материјала изолована укупна РНК и квалитет проверен на агарозном гелу (Слика 22). Установљено је да је изолована РНК задовољавајућег квалитета и концентрације. Изолована РНК је коришћена за реакцију реверзне транскрипције, а синтетисана комплементарна ДНК је представљала матрицу у реакцији квантитативног *PCR*, уз примену ген-специфичних прајмера.



Слика 22. РНК изолована из повређених и целих листова *C. erythraea* визуелизована етидијум бромидом на 1% агарозном гелу. 1) неповређена биљка, 2) цео лист 2 *h* након повреде, 3) повређен лист 2 *h* након повреде, 4) неповређен лист 4 *h* након повреде, 5) повређен лист 4 *h* након повреде, 6) цео лист 8 *h* након повреде, 7) повређен лист 8 *h* након повреде, 8) цео лист 16 *h* након повреде, 9) повређен лист 16 *h* након повреде, 10) цео лист 24 *h* након повреде, 11) повређен лист 24 *h* након повреде, 12) цео лист 48 *h* након повреде, 13) повређен лист 48 *h* након повреде, 14) цео лист 96 *h* након повреде, 15) повређен лист 96 *h* након повреде.

Анализиран је ниво експресије десет претпостављених биосинтетских гена: *CeGPPS*, *CeGES*, *CeG80*, *Ce8HGO*, *CeIS1*, *CeIS2*, *CeIO*, *Ce7DLGT*, *Ce7DLH2* и *CeSLS*, као и шест гена који кодирају за транскрипционе факторе: *CeCOII*, *CeJAZ*, *CeMYC2*, *CeBIS1*, *CeJAM2*, *CeJAM3*. Релативна експресија свих анализираних гена је нормализована у односу на експресију референтног гена за елонгациони фактор 1 (*CeEF1*). Просечан број циклуса у којем је достизан праг детекције (*Ct*) гена *CeEF1* је био уједначен у свим узорцима и износио је $18,32 \pm 0,07$.

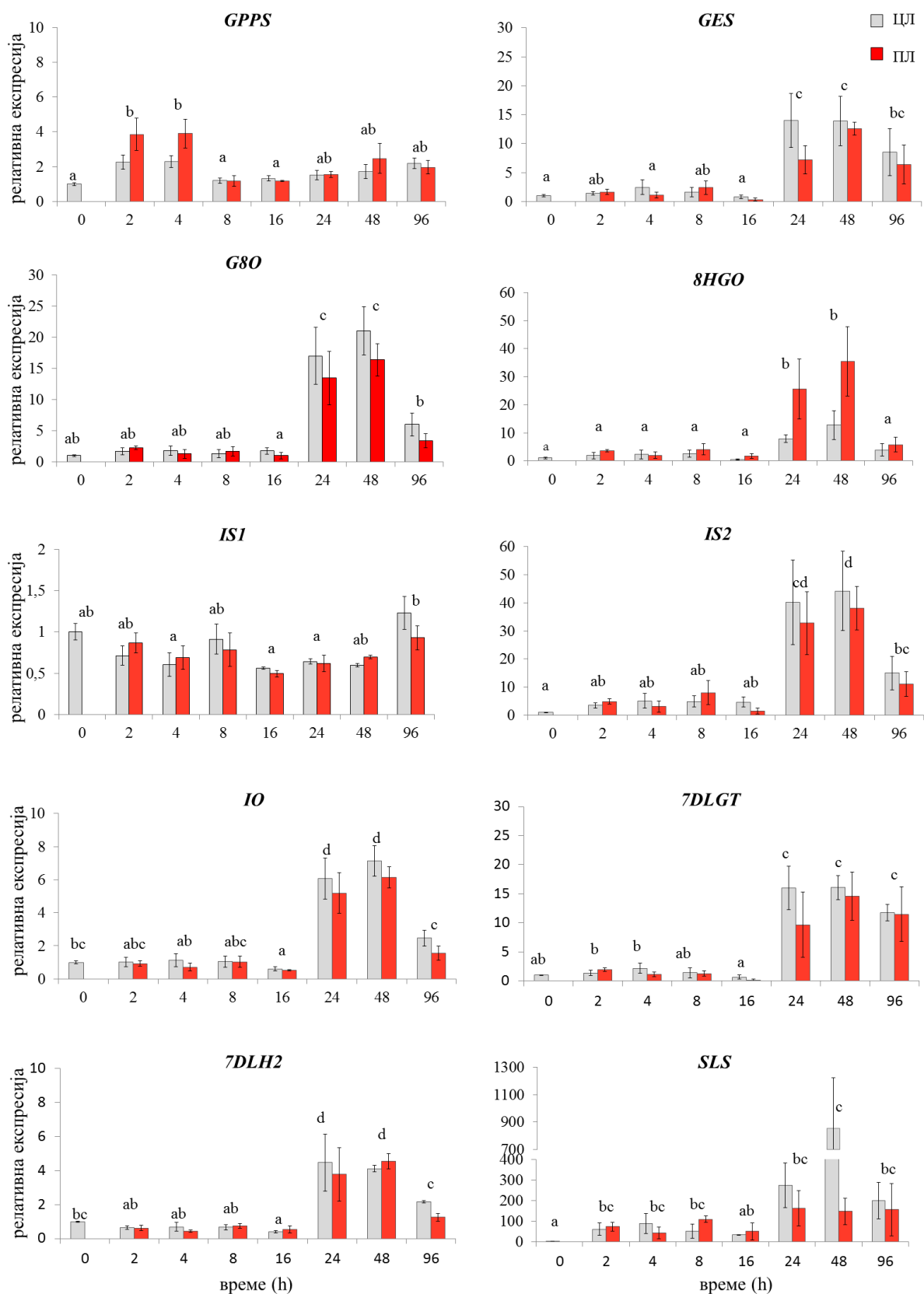
Специфичност амплификације анализираних гена коришћењем конструисаних прајмера потврђена је анализом крива температура топљења (*T_m*) продукта након *qPCR* реакције. Добијене су добро обликоване криве топљења са јасним јединственим максимумима температуре (Слика 23). Ефикасност свих *qPCR* реакција израчуната је на основу нагиба (енг. *slope*) стандардних крива и била је у опсегу препоручених вредности од 90-110%.



Слика 23. Примери збирних крива топљења *PCR* продуката које показују високу специфичност амплификације анализираних гена.

Информације о утицају стреса повређивањем на метаболизам секоиридоида код кичице добијене су анализом експресије биосинтетских гена. Утицај повреде на експресију ових гена у различитим временским интервалима анализиран је у целим и у повређеним листовима, а резултати су приказани на Слици 21. Експресија гена *CeLAMT* није презентована, с обзиром да је била испод нивоа детекције. Експресија гена *CeIS1* се није мењала након повреде, док је ниво експресије осталих девет гена укључених у биосинтетски пут секоиридоида повећана након механичке повреде листа како у повређеним, тако и у целим листовима кичице (Слика 24). Први ген биосинтетског пута секоиридоида *CeGPPS* кодира за ензим геранил дифосфат синтазу која катализује реакцију у којој од диметилалид дифосфата и изопентенил дифосфата настаје геранил дифосфат (Слика 21 А). Експресија гена *CeGPPS* се значано повећава 2 - 4 h након повреде, а затим се након 6 h враћа на контролни ниво. Значајно повећање нивоа експресије забележено је за гене *CeGES*, *CeG80*, *Ce8HGO*, *CeIS2*, *CeIO*, *Ce7DLGT* и *Ce7DLH2* након 24 h и 48 h од повреде. Експресија гена *CeGES*, *CeIS2* и *Ce7DLGT* се повећава 24 h након повреде и остаје значајно повећана и након 96 h. Са друге стране, експресија гена *CeG80*, *Ce8HGO*, *CeIO* и *Ce7DLH2* такође расте након 24 h, али се враћа на контролни ниво 96 h након повреде. Највећи пораст у експресији од око 800 пута у поређењу са контролом забележен је за ген који кодира за секологанин синтазу (*CeSLS*) и то 48 h након повреде. Факторијална анализа варијансе (Табела П1 у Прилогу) показала је да је време једини фактор који има значајан утицај на експресију анализираних биосинтетских гена након механичке повреде ($p < 0,05$), док разлике у експресији ових гена између ЦЛ и ПЛ нису биле статистички значајне ($p > 0,05$).

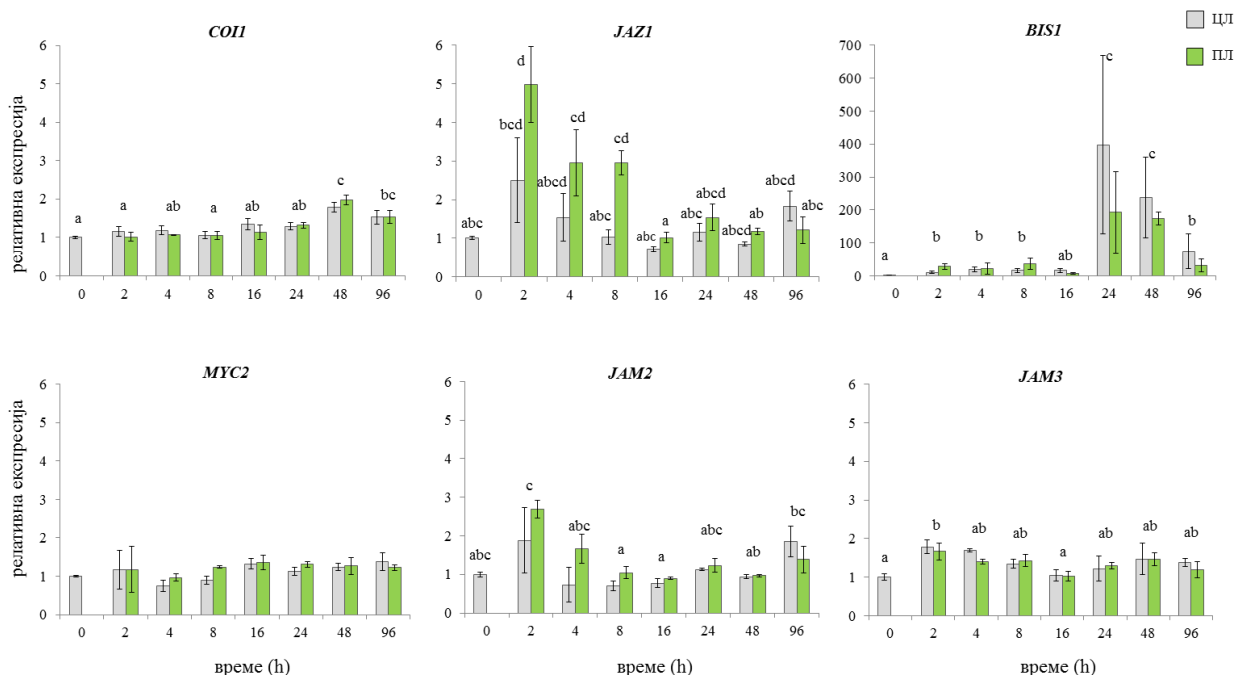
Анализом транскриптома листа кичице идентификовани су гени кандидати који кодирају за транскрипционе факторе за које се претпоставља да могу да учествују у регулацији биосинтезе секоиридоидних глукозида током одбрамбеног одговора на стрес повређивањем. Праћена је промена у експресији транскрипционих фактора *CeMYC2*, *CeBIS1*, *CeJAZ1*, *CeCOI1*, *CeJAM2* и *CeJAM3*. На основу *qPCR* анализе показано је да повреда утиче на промене у експресији гена који кодирају за транскрипционе факторе који су укључени у сигнални пут *JA* (Слика 25). Експресија *CeJAZ1* и *CeJAM3* индукована је 2 h након повреде док је пораст у експресији *CeCOI1* забележен 48 h након повређивања. Највећа промена, индукована механичким повређивањем ткива, забележена је у случају експресије гена *CeBIS1*. Висок ниво транскрипта овог гена уочава се већ 2 h након повреде, а достиже максимум 24 h након повређивања листа.



Слика 24. Релативна експресија гена укључених у биосинтетски пут секоиридоидних глукозида у повређеним и целим листовима *C. erythraea* у различитим временским интервалима након повреде. Релативна експресија сваког гена је приказана у односу на ниво експресије у контроли (неповређени лист на почетку експеримента - 0 h) којем је додељена вредност 1. Факторијална анализа варијансе је

показала да стање листа (ПЛ или ЦЛ) не утиче значајно на експресију гена, па је само значајност фактора време тестирана уз коришћење *post-hoc* поређења по Тукију (енг. *Tukey post hoc test*). Различитим словима су обележене статистички значајне разлике ($p < 0,05$). Скраћенице: GPPS геранил дифосфат синтаза, GES гераниол синтаза, G8O гераниол 8-оксидаза, 8HGO 8-хидроксигераниол оксидоредуктаза, IS иридоид синтаза, IO иридоид оксидаза, 7DLGT глукозил трансфераза 7-деоксилоганетинске киселине, 7DLH2 хидроксилаза 7-деоксилоганетинске киселине, SLS секологанин синтаза, ЦЛ цео лист, ПЛ повређен лист.

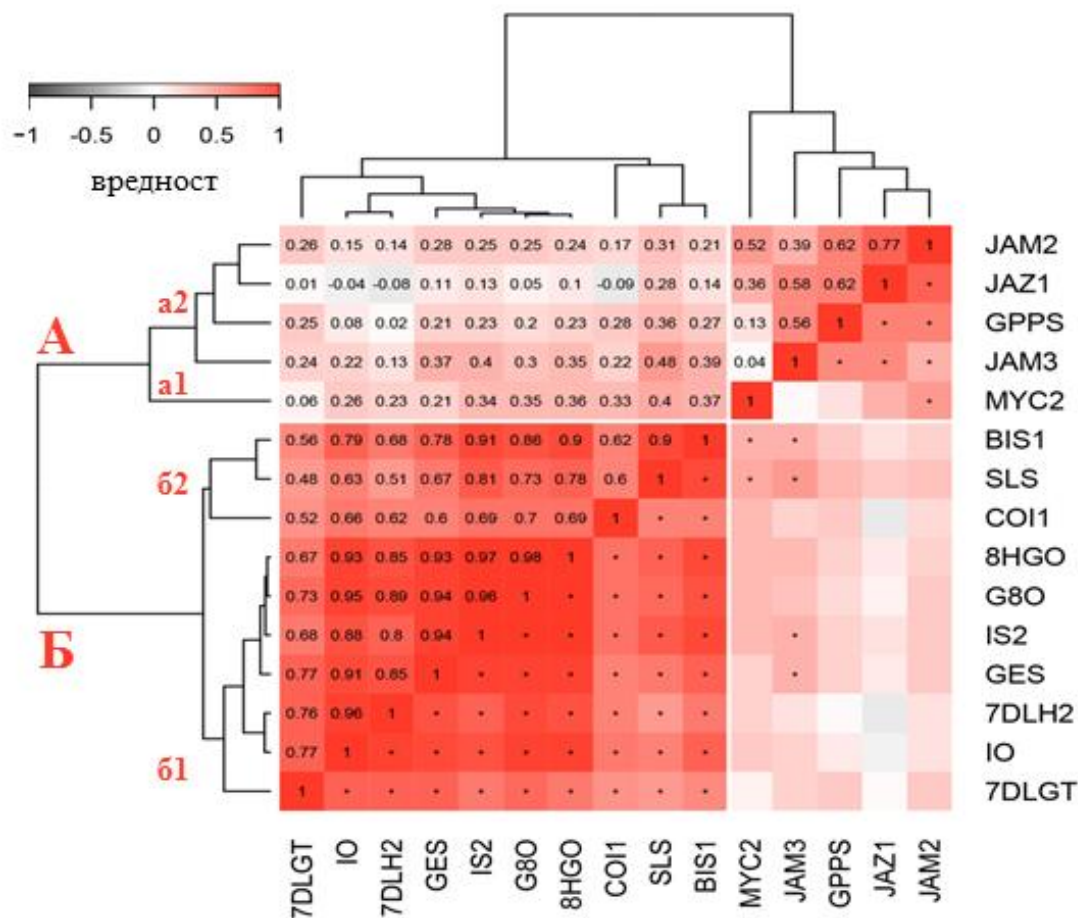
Факторијална анализа варијансе је открила разлике између фактора који утичу на експресију анализираних гена. Време након повреде је једини фактор који значајно утиче на разлике у експресији гена *CeCO11*, *CeBIS1*, *CeJAM2*, и *CeJAM3* ($p < 0,05$). На експресију *CeMYC2* гена утиче стање листа, док је експресија *CeJAZ1* гена условљена како временом након повреде и стањем листа, тако и интеракцијом ова два фактора (Табела П1 у Прилогу).



Слика 25. Релативна експресија гена за одабране транскрипционе факторе у листовима *C. erythraea* након механичког повређивања. Релативна експресија сваког гена је приказана у односу на ниво експресије у контроли (неповређени лист на почетку експеримента – 0 h) којем је додељена вредност 1. Факторијална *ANOVA* показала је да стање листа (ПЛ или ЦЛ) не утиче значајно на експресију гена *CO11*, *BIS1*, *JAM2* и *JAM3*. На експресију гена *MYC2* утиче само стање листа, док на експресију гена *JAZ1* утичу време, стање листа (повређен или цео), као и интеракција ова два фактора. За сваки ген је значајност независних променљивих тестирана уз коришћење *post-hoc* поређења по Тукију (енг. *Tukey post hoc test*). Различитим словима су обележене статистички значајне разлике ($p < 0,05$). Скраћенице: ЦЛ - цео лист, ПЛ - повређен лист

Резултати хијерархијске кластер анализе су пружили бољи увид у повезаност између биосинтетских гена и транскрипционих фактора након механичке повреде листова кичице. На основу резултата јасно су се раздвојиле две групе гена (Слика 26). У прву групу (А) се сврстава већина транскрипционих фактора: *CeJAM2*, *CeJAM3*, *CeJAZ1* и *CeMYC2*, као и ген који је укључен у биосинтетски пут секоиридоида - *CeGPPS*. Група А се даље може поделити на подгрупу **a1**, којој припада *CeMYC2* и подгрупу **a2**, у којој се налазе груписани сви остали гени чланови групе А. Преостали анализирани гени се групишу у кластер Б, који

се даље грана на подгрупу **61** која обухвата: *CeGES*, *CeG8O*, *Ce8HGO*, *CeIS*, *CeIO*, *Ce7DLGT* и *Ce7DLH2* и подгрупу **62**, у којој се налазе *CeCOII*, *CeSLS* и *CeBISI*.

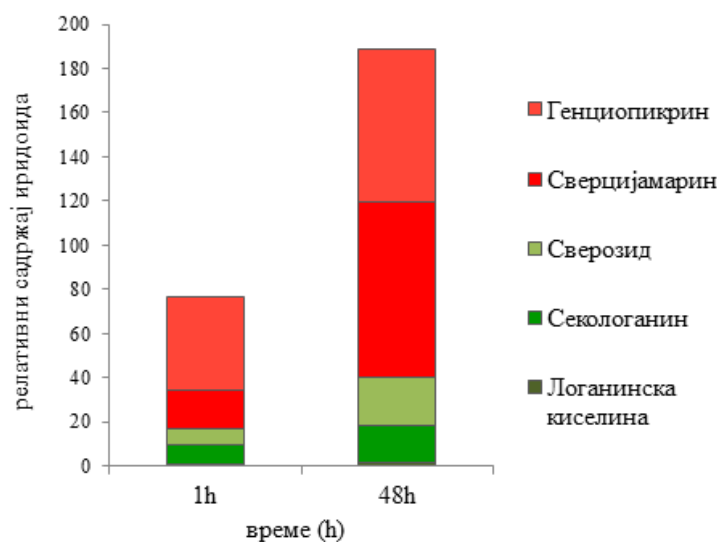


Слика 26. Топлотна мапа расподеле (енг. *heat map*) *Pearson* корелација заснована на релативној експресији биосинтетских гена и гена за транскрипционе факторе. Коефицијенти *Pearson* корелације су приказани у горњем левом троуглу матрице, док су статистичке значајности корелације приказане звездицама ($p < 0,01$) у доњем десном троуглу матрице. Распоред гена у топлотној мапи одређен је на основу хијерархијске анализе кластера која је урађена на основу дистанционе матрице која је била једнака 1 – корелациона матрица експресије гена (минимална дистанца одговара апсолутно позитивној *Pearson* корелацији између експресије гена, док максимална дистанца одговара апсолутно негативној *Pearson* корелацији). Дендограми хијерархијске анализе кластера приказани су са леве и горње стране топлотне мапе.

Корелациона анализа је спроведена у циљу даљег раздвајања транскрипционих фактора који су ко-експримирани са генима биосинтетског пута секоиридоида (Слика 26). Резултати су указали на позитивну корелацију између биосинтетских гена и транскрипционих фактора, па је тако висок степен корелације забележен између *CeBISI* и биосинтетских гена, првенствено *CeSLS*, *CeIS2* и *Ce8HGO*, док је нижи степен корелације забележен између *CeCOII* и биосинтетских гена. Степен корелације експресије преосталих гена који кодирају за транскрипционе факторе са биосинтетским генима је био значајано нижи, при чему *CeJAZ1* и *CeJAM2* нису били у корелацији ни са једним биосинтетским геном осим са *CeGPPS*. Статистички значајна корелација у експресији је утврђена између *CeJAM3* и *CeGPPS*, *CeGES*, *CeIS2* и *CeSLS*, као и између *CeMYC2* и *CeSLS*.

4.2.4. Улога сигналног пута јасмонске киселине у регулацији биосинтезе секоиридоида кичице

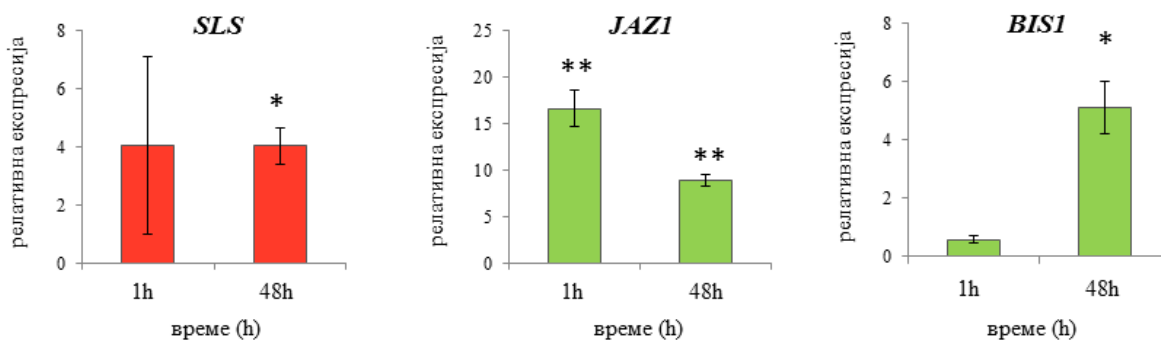
Како би даље потврдили учешће сигналног пута *JA* у регулацији метаболизма секоиридоидних глукозида у листовима кичице, биљке кичице су третиране *MeJA*, с циљем елицитације биосинтезе ових једињења. У експериментима су коришћене клонално пропагиране јединке, претходно селектованог генотипа П1 кичице које су гајене током 1 *h* или 48 *h* на хранљивој подлози са додатком 250 μM *MeJA*. Ови временски интервали су одабрани због тога што је у експерименту повређивања листова показано да се експресија гена за транскрипционе факторе значајно мења након 2 *h* (*CeJAZ1* и *CeJAM3*) или 48 *h* (*CeCOI1*, *CeBIS1*) од повређивања. Истовремено, значајан пораст иридоида и секоиридоида видљив је почев од 24 *h* након повређивања листова. Праћена је експресија гена *CeSLS*, *CeJAZ1* и *CeBIS1* који су показали значајну и брзу промену нивоа експресије након повређивања листова кичице. Ген *CeSLS* је раније означен као ген биосинтетског пута секоиридоида који има кључну улогу у регулацији метаболичког флукса, а гени *CeJAZ1* и *CeBIS1* кодирају за транскрипционе факторе са познатом улогом у сигналном путу *JA*.



Слика 27. Садржај иридоида у листовима кичице гајеним 1 *h* и 48 *h* на подлози са додатком *MeJA*, изражен релативно, у односу на листове нетретираних јединки које су узорковане симултано са третираним јединкама.

Резултати хемијске анализе су указали да је садржај СЛОГ, СВ, СВМ и ГП повећан у листовима кичице гајеним 48 *h* на подлози са додатком *MeJA*, док у биљкама које су 1 *h* гајене на подлози са додатком *MeJA* нису уочене промене садржаја секоиридоида у односу на одговарајућу контролу (нетретиране јединке) (Слика 27).

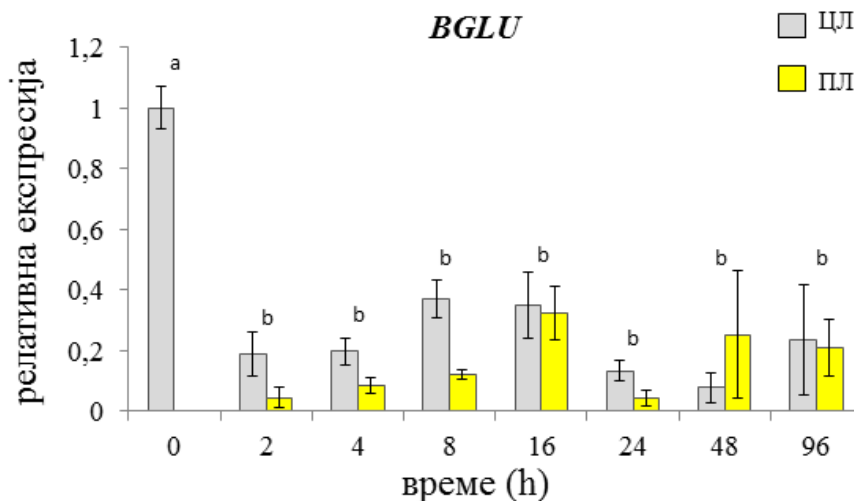
Слично као у експерименту повређивања, статистички значајно повећање нивоа експресије *CeSLS* и *CeBIS1* уочено је у листовима кичице гајеним 48 *h* на подлози са додатком *MeJA*, док је ниво експресије гена *CeJAZ1* повећан већ након 1 *h* гајења на подлози са додатком елицитора (Слика 28), што указује да *CeJAZ1* међу првим генима у сигналном путу *JA* реагује променом на нивоу експресије.



Слика 28. Релативна експресија гена *CeSLS*, *CeJAZ1* и *CeBIS1* у листовима кичице гајеним 1 h и 48 h на подлози са додатком *MeJA*. Вредности су представљене релативно, у односу на одговарајуће контроле (нетретирани јединке након 1 h или 48 h од почетка експеримента). Статистички значајна разлика према *t*-тесту означена је звездицама: * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$

4.2.5. Улога β -глукозидаза у одбрамбеном одговору кичице на стрес изазван повређивањем листова

Резултати анализе експресије гена за β -глукозидазу у повређеним и целим листовима кичице у различитим интервалима након механичког повређивања листова указују да долази до опадања нивоа експресије овог гена већ након 2 h, те да ниво транскрипата остаје значајно нижи у односу на контролу током трајања експеримента. Експресија гена за β -глукозидазу не зависи од стања листова и опада како у целим (ЦЛ), тако и у повређеним (ПЛ) листовима (Слика 29).



Слика 29. Релативна експресија гена за ензим β -глукозидазу у листовима *C. erythraea* у различитим временским интервалима након повређивања листова. Релативна експресија сваког гена је приказана у односу на ниво експресије у контроли (неповређени лист на почетку експеримента – 0 h) којем је додељена вредност 1. Факторијална ANOVA показала је да стање листа (ПЛ или ЦЛ) не утиче значајно на експресију гена *CeBGLU*, стога је тестирана само значајност фактора време уз коришћење *post-hoc* поређења по Тукију (енг. *Tukey post hoc test*). Различитим словима су обележене статистички значајне разлике ($p < 0,05$). Скраћенице: ЦЛ - цео лист, ПЛ - повређен лист

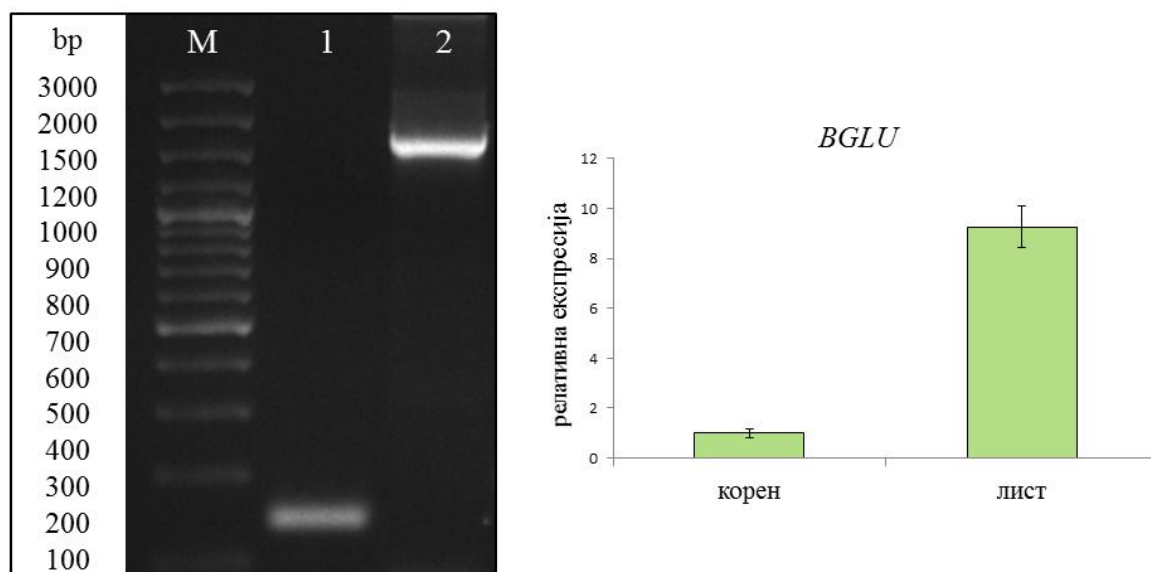
Уочљив је супротан тренд експресије *CeBGLU* након повређивања листова кичице у односу на већину гена укључених у биосинтезу секоиридоидних глукозида, што је навело на

претпоставку да овај хидролитички ензим има значајну улогу током одбрамбеног одговора кичице на стрес повређивањем. Уследила је изолација пуне дужине гена *CeBGLU* и функционална карактеризација ензима који показују високу специфичност за секоиридоидне глукозиде кичице као супстрате.

4.3. Изолација и карактеризација ензима β -глукозидазе из врсте *C. erythraea*

4.3.1. Изолација и клонирање гена кандидата за ензим β -глукозидазу из кичице

Ген кандидат за ензим β -глукозидазу из кичице (*CeBGLU*) издвојен је поређењем транскриптома надземног дела кичице са секвенцом функционално окарактерисане стриктозидин- β -глукозидазе из врсте *Catharanthus roseus*. Секвенца из транскриптома кичице која је показала највећи степен хомологије нуклеотида са секвенцом гена описаног код врсте *C. roseus* је издвојена, а затим су на основу ове секвенце дизајнирани одговарајући прајмери за изолацију пуне дужине (1659 базних парова) гена кандидата за ензим β -глукозидазу кичице (*CeBGLU*). Укупна РНК листова кичице изолована је из свежих листова, а затим је у реакцији реверзне транскрипције синтетисана комплементарна ДНК која је послужила као матрица за амплификацију потпуне комплементарне ДНК гена кандидата за ензим β -глукозидазу. На агарозном гелу добијен је продукт очекиване дужине (слика 30 А).



Слика 30. Амплификација и релативна експресија гена за β -глукозидазу *C. erythraea*. А. Амплификација пуне дужине гена за β -глукозидазу, визуелизована етидијум бромидом на 1% агарозном гелу: М) ДНК маркер (*Thermo Scientific O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use*), 1) производ *PCR* реакције са прајмерима за анализу експресије гена, 2) производ *PCR* реакције са прајмерима за изолацију пуне дужине гена. Б. Релативна експресија гена *CeBGLU* у листовима и кореновима врсте *C. erythraea*.

На основу секвенце из транскриптома кичице поред прајмера за изолацију пуне дужине гена конструисани су и прајмери за анализу експресије гена за ензим β -глукозидазу (дужина амплификованог производа износи 142 базна пара). Након пробне *PCR* амплификације на гелу је детектован продукт очекиване дужине (Слика 30 А). Резултати *qPCR* анализе

експресије гена су показали да је ниво експресије *CeBGLU* девет пута већи у листовима у односу на ниво експресије у корену кичице (Слика 30 Б).

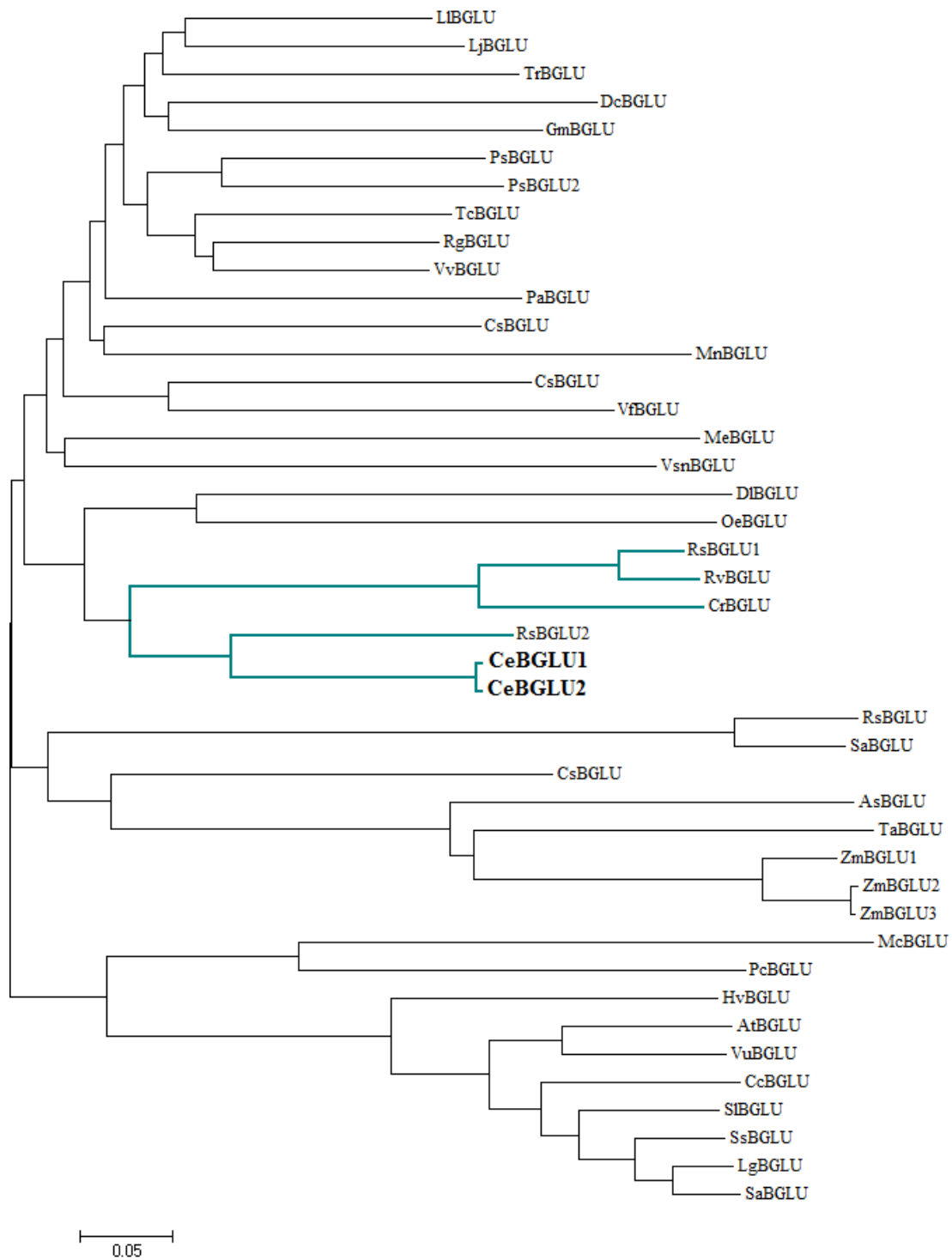
Након што је изолован, ген пуне дужине је клониран у *pTZ57R/T* вектор, а исправност клонирања је проверена секвенцирањем. На основу добијених података установљено је да постоје два гена кандидата за β -глюкозидазу који су означени као *CeBGLU1* и *CeBGLU2*. Секвенце ова два гена међусобно се разликују само у 12 нуклеотида а разлика на нивоу протеина износи 4 аминокиселине (Слике П1 и П2 у Прилогу). Пуна дужина гена кандидата (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*) износи 1659 базних парова и они кодирају протеине од 552 аминокиселине (Слика 31).

		1	60
RsRBGLU	(1)	-----MATQSSAVIDSNDATRISRSDFPADFIMGTG	
CeBGLU1	(1)	-----MAILKRSGRIVPSGASMISRGLDFPADFVFGSA	
CeBGLU2	(1)	-----MAILKRSGRIVPSGASMISRGLDFPADFVFGSA	
CrSBGLU	(1)	MGSKDDQSLVVAISPAAEPNGNHSVPIPFAYPSIPIQPRKHNKPIVHRRDFPSPDFILGAG	
RvSBGLU	(1)	MESNQGEPLVVAIVPKPNASTEQ-----KNSHLIPATRSKIVVHRRDFPQDFVFGAG	
RsSBGLU	(1)	MDNTQAEPLVVAIVPKPNASTEH-----TNSHLIPVTRSKIVVHRRDFPQDFIFGAG	
		61	120
RsRBGLU	(32)	SSAYQIEGGARDGGRGPSIWDTFTHRRPDMIRGGTNGDVAVDSYHLYKEDVNILKNLGLD	
CeBGLU1	(33)	TAAAYQVEGGAREGGRGPSIWDTFTHRRPDMIKGGNGDVAVDSYHLYKEDIQLLKNIGLD	
CeBGLU2	(33)	TAAAYQVEGGAREGGRGPSIWDTFTHRRPDMIKGGNGDVAVDSYHLYKEDIQLLKNIGLD	
CrSBGLU	(61)	GSAYQCEGAYNEGNRGPSIWDTFTNRYPAKIDGNSNGQAINSYNLYKEDIKIMKQTGLE	
RvSBGLU	(53)	GSAYQCEGAYNEGNRGPSIWDTFTQRTPAKISDGSNGQAINCYHMYKEDIKIMKQAGLE	
RsSBGLU	(53)	GSAYQCEGAYNEGNRGPSIWDTFTQSPAKISDGSNGQAINCYHMYKEDIKIMKQTGLE	
		121	180
RsRBGLU	(92)	AYRFSISWSRVLPGGRLSGGVNKEGINYYNLLIDGLLANGIKPFVTLFHWDPQALEDEY	
CeBGLU1	(93)	AYRLSISWSRVLPGGNLTGGVNKEGIDYNSLIDDLLANGIQPFVTLFHWDPQALEDEY	
CeBGLU2	(93)	AYRLSISWSRVLPGGNLTGGVNKEGIDYNSLIDDLLANGIQPFVTLFHWDPQALEDEY	
CrSBGLU	(121)	SYRFSISWSRVLPGGNLSGGVNKDGVKFYHDFIDELLANGIKPFATLFWHDLQALEDEY	
RvSBGLU	(113)	AYRFSISWSRVLPGGRLAAGVNKDGVKFYHDFIDELLANGIKPFATLFWHDLQALEDEY	
RsSBGLU	(113)	SYRFSISWSRVLPGGRLAAGVNKDGVKFYHDFIDELLANGIKPSVTLFWHDLQALEDEY	
		181	240
RsRBGLU	(152)	GGFLSPRIVDDFCEYAEFCFWEFGDRVKHWMITLNEPWTFSVHGYATGLYAPGRGRTSPEH	
CeBGLU1	(153)	GGFLSPRIVDDFRQYVELCFWEFGDRVKHWITLNEPSTFSDAGYASGVYAPGRGSTSPAL	
CeBGLU2	(153)	GGFLSPRIVDDFRQYVELCFWEFGDRVKHWITLNEPSTFSDAGYASGVYAPGRGSTSPDL	
CrSBGLU	(181)	GGFLSDRIVEDFTEYAEFCFWEFGDKIKYWTTFNEPHTYVASGYATGEFAPGRG-----	
RvSBGLU	(173)	GGFLSHRIVDDFCEYAEFCFWEFGDKIKYWTTFNEPHTFTANGYALGEFAPGRG-----	
RsSBGLU	(173)	GGFLSHRIVDDFCEYAEFCFWEFGDKIKYWTTFNEPHTFAVNGYALGEFAPGRG-----	
		241	300
RsRBGLU	(212)	VNH--PTVQHRCSSTVAPQCICSTGNPGTEPYWVTHHLLLAHA AVELYKKNKFQRQEGQI	
CeBGLU1	(213)	LQHRLRSAPSRTSPWGPCHCKSSHGNPGTEPYIVTHHLLLAHATAVELYRNKFKQSQGGSI	
CeBGLU2	(213)	LQHRLRSAPSRTSPWGPCHCKSSHGNPGTEPYIVTHHLLLAHATAVELYRNKFKQSQGGSI	
CrSBGLU	(236)	-----ADKGEGPGKEPYIATHNLLLSHKA AVEVYRNKFKQKQGGEI	
RvSBGLU	(227)	-----KNGKGDPAITEPYLVTHNILLAHKA AVEAYRNKFKQKQEGEI	
RsSBGLU	(228)	-----KGDEGDPAIEPYVVTHNILLAHKA AVEEYRNKFKQKQEGEI	
		301	360
RsRBGLU	(270)	GISHATQWMEPWDENSASDVEAARALDFMLGWFMEPITSGDYPKSMKKFVGSRLPKFSP	
CeBGLU1	(273)	GITLISQWREPLND-TEADRKAAKRALDFMFGWYMDPITSGDYPESMKELVGSRLPKFSP	
CeBGLU2	(273)	GITLICQWREPLND-TEADRKAAKRALDFMFGWYMEPITSGDYPESMKELVGSRLPKFSP	
CrSBGLU	(277)	GIVLNSMWMPEPLNE-TKEDIDAREGLDFMLGWFIEPLTTGEYPKSMRALVGSRLPEFST	
RvSBGLU	(268)	GIVLNSTWMEPLND-VQADIDAHKRALDFMLGWFIEPLTTGDYPKSMREIVKGRLPFRSP	
RsSBGLU	(269)	GIVLNSMWMPEPLSD-VQADIDAQKRALDFMLGWFLEPLTTGDYPKSMRELVKGRLPKFS	
		361	420
RsRBGLU	(330)	EQSKMLKGSYDFVGLNYTASYVTNASTNSSGSNNFSYNTDIHVTY-ETDRNGV----PI	
CeBGLU1	(332)	DESKKLRGSYDFLGLNYTGTIVTDAPKSTG--EMLSYDTHAVTY-TYERNK----LI	
CeBGLU2	(332)	EESKKLRGSYDFLGLNYTGTIVTDAPKSTG--EMLSYDTHAVTY-TYERNK----LI	
CrSBGLU	(336)	EVSEKLTGCYDFIGMNYTTTYVSNADKIP---DTPGYETDARINKNIFVKKVDGKEVRI	

RvSBGLU	(327)	EDSEKLGKGCYDFVGMNYYTATYVTNAAKSNS--EKLSYETDDHVDK-TFDRVVDGKSVPI	
RsSBGLU	(328)	DDSEKLGKGCYDFIGMNYYTATYVTNAVKSNS--EKLSYETDDQVTK-TFERNQK----	PI 480
		421	
RsRBGLU	(385)	GPQSGSDWLLIYPEGIRKILVYTKKTYNVPLIYVTENGVDVVK-----NTNLTLSLSE	
CeBGLU1	(385)	GPKAASDWLHMYPEGMYKLLIYTKNTYNVPLIYITENGVDVVK-----NTSLTSLSE	
CeBGLU2	(385)	GPKAASDWLHMYPEGMYKLLIYTKNTYNVPLIYITENGVDVVK-----NTSLTSLSE	
CrSBGLU	(393)	GEPCYGGWQHVVPSGLYNLLVYTKKTYHVPVIYVSECGVVEENRTNILLTEGKTNILLTE	
RvSBGLU	(384)	GAVLYGEWQHVVPWGLYKLLVYTKETYHVPVLYVTESGMVEEN-----KTKILLSE	
RsSBGLU	(381)	GHALYGGWQHVVPWGLYKLLVYTKETYHVPVLYVTESGMVEEN-----KTKILLSE	540
		481	
RsRBGLU	(436)	ARKDSMRLKYLQDHIFNVRQAMNDGVNVKGYFAWSLLDNFEWGEYGVRFGI IHIDYNDN	
CeBGLU1	(436)	ARQDTIRIKFIQDHLYNLLRAMKEGVNVKGYFIWSLLDNFEWNEGYTVRFGI VHVDYNDN	
CeBGLU2	(436)	ARQDTIRIKFIQDHLYNLLRAMKEGVNVKGYFIWSLLDNFEWNEGYTVRFGI VHVDYNDN	
CrSBGLU	(453)	ARHDKLRVDFLQSHLASVRDAIDGDNVKGFFVWSFFDNFEWNLGYICRYGI IHVDYKT-	
RvSBGLU	(435)	ARRDPERTDYHQKHLASVRDAIDGDNVKGFFVWSFFDNFEWNLGFIGRYGI IHVDYNS-	
RsSBGLU	(432)	ARRDAERTDYHQKHLASVRDAIDGDNVKGFFVWSFFDNFEWNLGYICRYGI IHVDYKS-	597
		541	
RsRBGLU	(496)	FARYPKDSAVWLMNSFHKNISKLPVKRS--IR-EDDEEQVSSKRLRK-----	
CeBGLU1	(496)	NARYPKDSAIWLFSSFNKNMSTNVSFIKNGCVFISTIFKYVGTMLLSK CISATEFSN	
CeBGLU2	(496)	NARYPKDSAIWLFSSFNKNMSTNVSFIKNGCVFISTIFKYVGTMLLSK CISATEFSN	
CrSBGLU	(512)	FQRYPKDSAIWYKNFISEGFVNTAKKRF-----REEDKLVELVKKQKY-----	
RvSBGLU	(494)	FERCPKESAIWYKNFIAGVSTTSPAK-RR-----REEAEGVELVKKRQKT-----	
RsSBGLU	(491)	FERYPKESAIWYKNFIAGKSTTSPAK-RR-----REEAQ-VELVKKRQKT-----	

Слика 31. Приказ поређења аминокиселинских секвенци ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2* са најсличнијим секвенцама ензима за β -глюкозидазу из врста *Rauwolfia serpentina*, *Rauwolfia verticilata* и *Catharanthus roseus*: *RsRBGLU*, *CrSBGLU*, *RvSBGLU* и *RsSBGLU*. У Табели П2 прилога приказани су описи коришћених скраћеница за биљне врсте и приступни бројеви ензима.

На основу познатих аминокиселинских секвенци раније окарактерисаних β -глюкозидаза, конструисано је филогенетско стабло (Слика 32) коришћењем софтвера *MEGA 6* (Tamura и сар., 2013). На основу резултата филогенетске анализе уочава се да је протеин раукафрицин-*O*- β -*D*-глюкозидаза, изолован из врсте *Rauwolfia serpentina* (Warzecha и сар., 2000), еволутивно најсличнији β -глюкозидазама *C. erythraea* (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*). Сличност аминокиселинских секвенци β -глюкозидаза врсте *C. erythraea* и раукафрицин-*O*- β -*D*-глюкозидазе из *R. serpentina* износи више од 65% (Табела 25). Поред тога, протеинске секвенце *CeBGLU1* и *CeBGLU2* показале су висок степен сличности и са стриктозидин *O*- β -*D*-глюкозидазом из врсте *R. serpentina* (Xia и сар., 2012), стриктозидин- β -*D*-глюкозидазом из врсте *C. roseus* (Geerlings и сар., 2000), као и са стриктозидин- β глюкозидазом из врсте *R. verticilata* (Xu и сар., 2012) (Слика 31). У Табели П2 у Прилогу приказани су описи коришћених скраћеница за биљне врсте и приступни бројеви ензима у *on line* базама података. Сличност секвенци за стриктозидин- β -*D*-глюкозидазе из наведених биљних врста са аминокиселинским секвенцама за кандидате β -глюкозидазе код *C. erythraea* варирала је од 47,1 % до 51% (Табела 25).



Слика 32. Филогенетска анализа аминокиселинских секвенци ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2* која показује њихову повезаност са осталим познатим биљним β -глукозидазама. Филогенетско стабло је конструисано коришћењем *neighbor-joining* методе *MEGA 6* софтверског пакета. У Табели П2 прилога приказани су описи коришћених скраћеница за биљне врсте и приступни бројеви ензима у *on line* базама података.

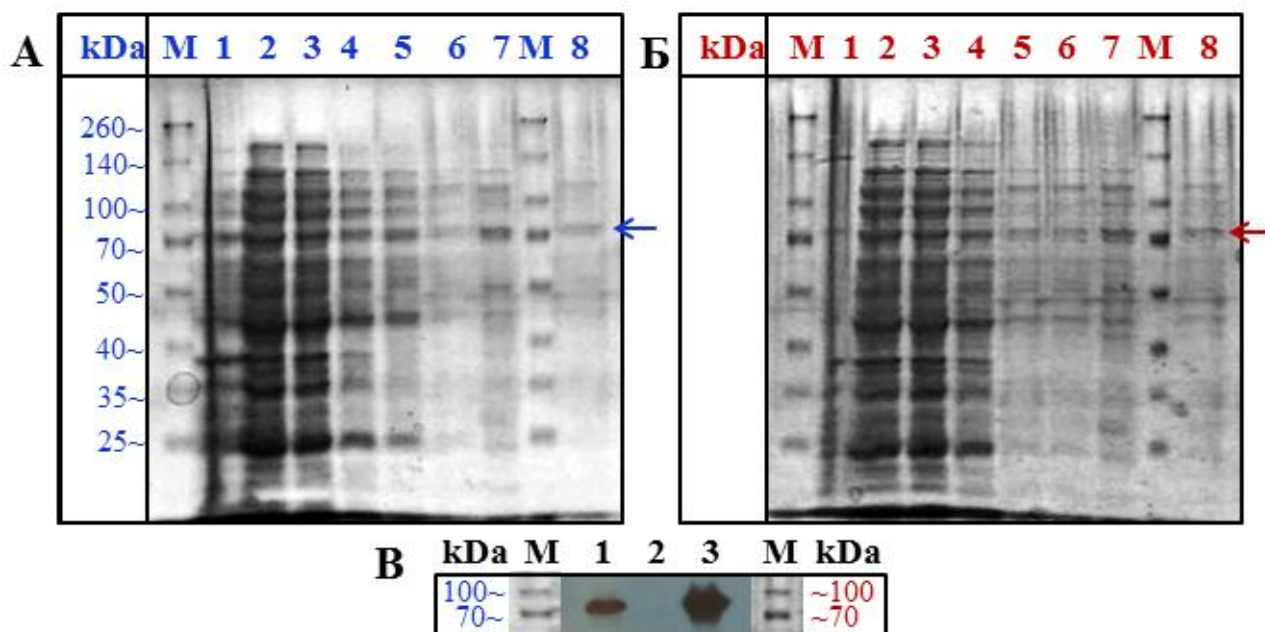
Табела 25. Сличност аминокиселинских секвенци *CeBGLU1* и *CeBGLU2* са најсроднијим биљним β -глукозидазама из врста *R.serpentina*, *R. verticilata* и *C. roseus*, изражена у процентима (%).

Идентичност (%)	<i>CeBGLU1</i>	<i>CeBGLU2</i>	<i>RsRBGLU</i>	<i>RsSBGLU</i>	<i>RvSBGLU</i>	<i>CrSBGLU</i>
<i>CeBGLU1</i>	100	99.3	65.8	51.2	50.9	47.1
<i>CeBGLU2</i>	99.3	100	66.1	51.0	51.0	47.3

Сви наведени ензими који показују висок степен сличности са *CeBGLU1* и *CeBGLU2* припадају великој ензимској фамилији глукозидних хидролаза 1 (*GHI*), што указује да гени изоловани из кичице такође припадају овој групи ензима. Међутим, филогенетско груписање аминокиселинских секвенци није сигуран доказ да груписани протеини поседују исте или сличне функције. Да би се ензиму доделила одређена функција неопходно је испитати његову активност у *in vitro* тесту на што већем броју супстрата. Изоловани гени су за потребе хетерологе експресије уграђени у *pRSETA* вектор дизајниран за експресију хетерологих протеина у *E. coli*. Исправност клонирања гена од интереса у *pRSETA* вектор проверена је секвенцирањем. У сврху хетерологе експресије гена кандидата трансформисане су компетентне ћелије *BL21 CodonPlus* соја *E. coli*. Успешност трансформације *BL21 CodonPlus* соја *E. coli* проверена је техником *PCR* на бактеријским колонијама. Одабране колоније трансформисане плазмидом који у себи носи ген од интереса су након тога гајене у циљу индукције експресије *CeBGLU1* и *CeBGLU2* и изолације одговарајућих рекомбинантних протеина (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*).

4.3.2. Индукција хетерологе експресије и пречишћавање рекомбинантних протеина *CeBGLU1* и *CeBGLU2*

Експресија рекомбинантних ензима у *BL21 CodonPlus* соју *E. coli* тестирана је под различитим условима у циљу проналажења оптималних параметара за синтезу ензима. За индукцију експресије изо-пропил- β -D-тиогалактозидом (*IPTG*) коришћене су четири различите концентрације једињења (0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM и 1 mM), при различитим почетним вредностима *OD*₆₀₀ бактеријске суспензије (*OD*₆₀₀ = 0,4; *OD*₆₀₀ = 0,6 и *OD*₆₀₀ = 0,8). Испитиван је утицај различитог времена инкубације бактеријске културе након индукције експресије (1 h, 2 h, 3 h и 4 h) и различитих температура за гајење бактерија (18 °C, 21 °C и 37 °C). Највећи принос рекомбинантних протеина постигнут је након 4 h инкубације бактеријске течне културе на 21 °C, када је експресија индукована 0,1 mM *IPTG* при оптичкој густини бактеријске културе од *OD*₆₀₀ = 0,4. Ови услови коришћени су за производњу рекомбинантних протеина (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*) у бактеријама на већој скали у циљу њихове изолације и провере функције у *in vitro* ензиматским тестовима.



Слика 33. SDS-PAGE анализа резултата пречишћавања *CeBGLU1* (А) и *CeBGLU2* (Б) протеина: М, протеински маркер. 1, нерастворни лизат. 2, растворни лизат. 3, фракција која се није везала за Ni-NTA агарозу. 4, прво испирање. 5, друго испирање. 6, треће испирање. 7, фракција која је остала везана за Ni-NTA агарозу. 8, елуирани протеин. Стрелица показује траке протеина *CeBGLU1* (А) и *CeBGLU2* (Б). (В) *Immuno blot* анализа пречишћених протеина *CeBGLU1* и *CeBGLU2* са *anti-His* антителима: М, протеински маркер. 1, *CeBGLU1* елуција протеина. 2, негативна контрола. 3, *CeBGLU2* елуција протеина.

Након раздвајања денатурираних протеина на полиакриламидном гелу уочено је да протеини *CeBGLU1* и *CeBGLU2* показују већу молекулску масу (~ 10 kDa) у односу на предвиђену која износи 62 kDa (Слика 33 А, 33 Б). Присуство протеина од интереса потврђено је *Immuno blot* анализом (Слика 34 В) коришћењем *anti-His* антитела, након чега је њихова функција испитивана различитим ензиматским тестовима.

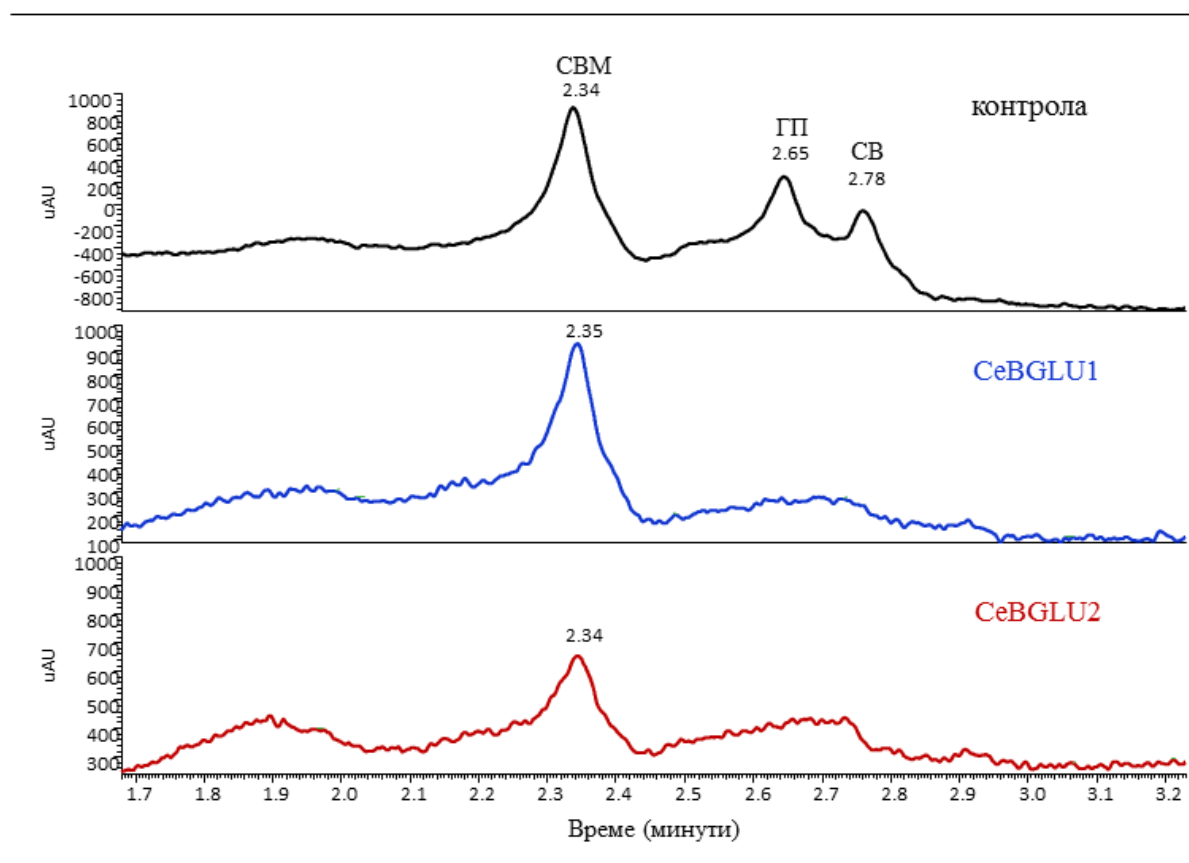
4.3.3. Потврда функције рекомбинантних β -глюкозидаза у ензиматским *in vitro* тестовима

Различити услови за извођење ензиматских реакција су испитани са комерцијалним супстратом 4-нитрофенил- β -D-глюкопиранозидом (*pNPG*), екстрактима *C. erythraea* и стандардима специјализованих метаболита. Успешна реакција хидролизе комерцијалног супстрата *pNPG* постигнута је у 50 mM цитрат фосфатном пуферу pH 5,5 са 10 mM и 5 mM *pNPG*. Укупна количина ензима у реакционој смеси била је 20 μ g, а инкубација је трајала 48 h при температури од 40 °C. Реакција је заустављена додавањем ледено хладног 1 M Na_2CO_3 . У реакцији са оба ензима (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*) дошло је до ослобађања жуте хромофоре 4-нитрофенола (*pNP*), чија је апсорбанца измерена спектрофотометријски на 410 nm. Хетерологи протеин *CeBGLU2* показао је већу специфичну активност од *CeBGLU1* при хидролизе комерцијалног супстрата (*pNPG*). У реакцији хидролизе *pNPG* протеином *CeBGLU2* настаје око 77% више продукта него у реакцији са *CeBGLU1* (Табела 26).

Табела 26. Специфична хидролитичка активност ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2* у *in vitro* реакцији са комерцијалним супстратом 4-нитрофенил- β -D-глукопиранозидом (*pNPG*)

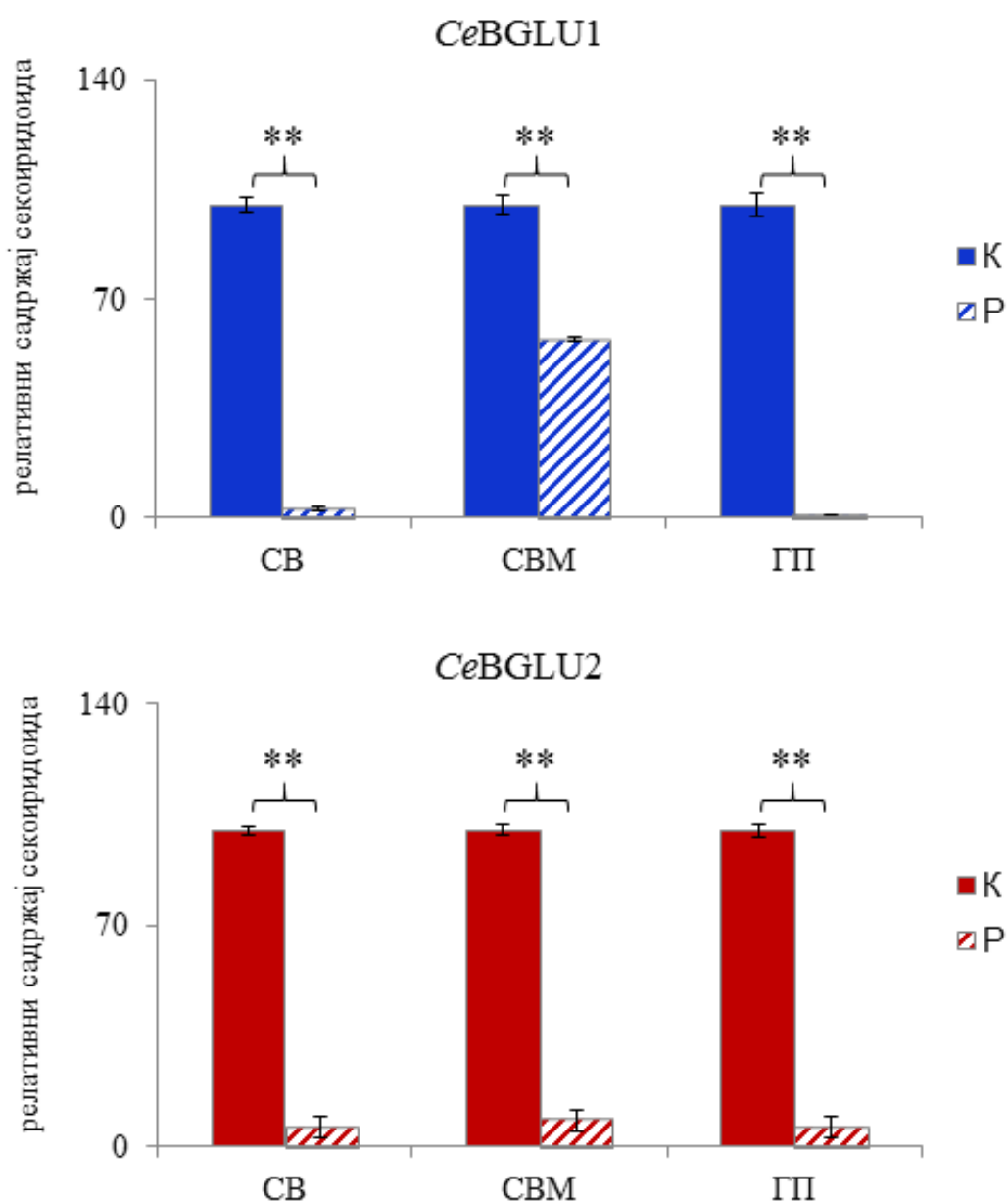
специфична активност [$nmol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ протеина]		
супстрат	Ензим	
	<i>CeBGLU1</i>	<i>CeBGLU2</i>
pNPG	2267,4 \pm 17,2	4028,5 \pm 28,7

Ефикасна хидролиза секоиридоидних глукозида постигнута је када је 10 μ l метанолног екстракта кичице упарено и растворено у реакционом пуферу (50 mM цитрат фосфатни пуфер pH 5,5). У свакој реакцији је коришћено 20 μ g пречишћеног ензима (*CeBGLU1* или *CeBGLU2*), а реакциона смеша је инкубирана током 48 h на 37 °C. Хемијском анализом установљено је да оба ензима показују хидролитичку активност на секоиридоидним глукозидима СВ, СВМ и ГП присутним у метанолном екстракту кичице (Слика 34).



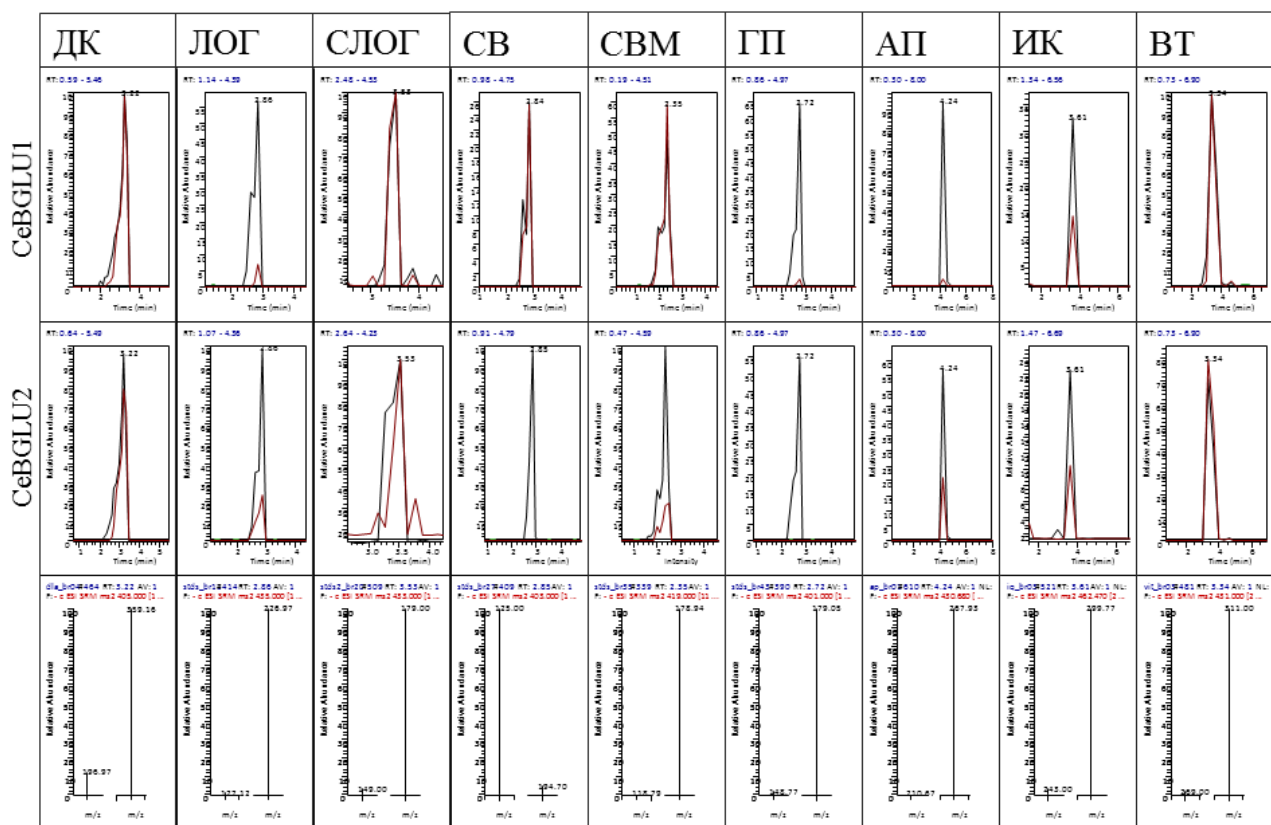
Слика 34. UHPLC-DAD хроматограми екстракта *C. erythraea* у контролним (нехидролизованом) узорцима (црна линија) и узорцима након реакције са протеинима *CeBGLU1* (плава линија) и *CeBGLU2* (црвена линија). Скраћенице: СВМ, сверцијамарин. ГП, генциопикрин. СВ, сверозид.

Разлика између протеина *CeBGLU1* и *CeBGLU2* се огледа у слабијој хидролитичкој способности *CeBGLU1* да хидролизује СВМ у екстракту кичице. *CeBGLU2* веома ефикасно хидролизује сва три секоиридоидна глукозида и смањује концентрације ових глукозида у хидролизованом екстрактима и до 90% у поређењу са нехидролизованом екстрактима (Слика 35).



Слика 35. Промена садржаја секоиридоидних глукозида (CB - сверозид, CBM - сверцијамарин и GP - генциопикрин) након хидролизе рекомбинантним протеинима *CeBGLU1* и *CeBGLU2*. K) контрола, P) реакциона смеша. Статистички значајна разлика према *t*-тесту означена је звездицама: ** - $p \leq 0,01$.

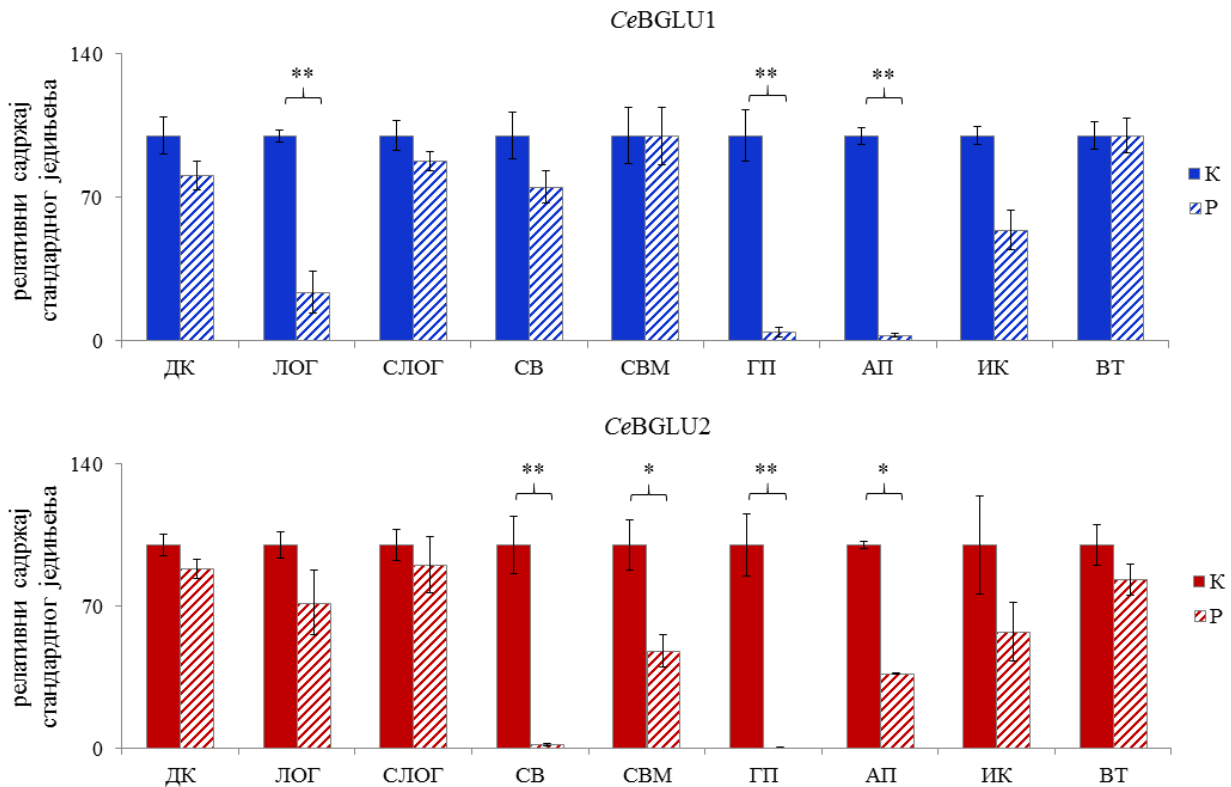
Хидролитичка способност пречишћених протеина *CeBGLU1* и *CeBGLU2* испитивана је такође на доступним стандардима једињења из групе фенола, иридоида и секоиридоида који поседују β -D-глукозидну везу. Као супстрат су коришћени: ДК, ЛОГ, СЛОГ, СВ, СВМ, GP, AP, ИК и ВТ. *SRM UHPLC/MS²* хроматограми и одговарајући *MS²* спектри стандардних једињења у реакцији са протеинима *CeBGLU1* и *CeBGLU2* приказани су на Слици 36.



Слика 36. SRM UHPLC/MS² хроматографи и одговарајући масени спектри стандардних једињења пре и након реакције са рекомбинантним протеинима CeBGLU1 и CeBGLU2. Црном линијом су означени пикови једињења у контролним узорцима, док су црвеном линијом обележена одговарајућа једињења након дејства рекомбинантних протеина. Скраћенице: ДК, епидеоксилоганинска киселина; ЛОГ, логанин; СЛОГ, секологанин; СВ, сверозид; СВМ, сверцијамарин; ГП, генциопикрин; АП, апигетрин; ИК, изокверцитрин; ВТ, витексин.

Резултати хемијске анализе су показали да хетерологи ензим CeBGLU2 ефикасније хидролизује секоиридоидне глукозиде у односу на CeBGLU1. Са друге стране, CeBGLU1 је показао израженију хидролитичку способност у реакцији са иридоидним глукозидом ЛОГ. У реакцији оба ензима са фенолом ИК забележен је тренд опадања овог једињења, међутим разлика у садржају у контролним узорцима и хидролизованом узорцима није статистички значајна (Слика 37).

За разлику од CeBGLU1 који није хидролизовао СВМ, CeBGLU2 је довео до опадања количине овог једињења у реакционој смеси за око 50%. Ензим CeBGLU1 је био најефикаснији у хидролизи ГП и АП, па су количине наведених једињења након хидролизе смањене на вредност испод 5%. Хетерологи протеин CeBGLU2 је такође показао снажно хидролитичко дејство у реакцији са ГП, али и са СВ, па је тако концентрација два поменута секоиридоидна глукозида у реакцији са CeBGLU2 након хидролизе била нижа од 2% (Слика 37). Са друге стране, ни један од тестираних протеина није показао значајну хидролитичку активност у реакцији са ДК, СЛОГ и ВТ.

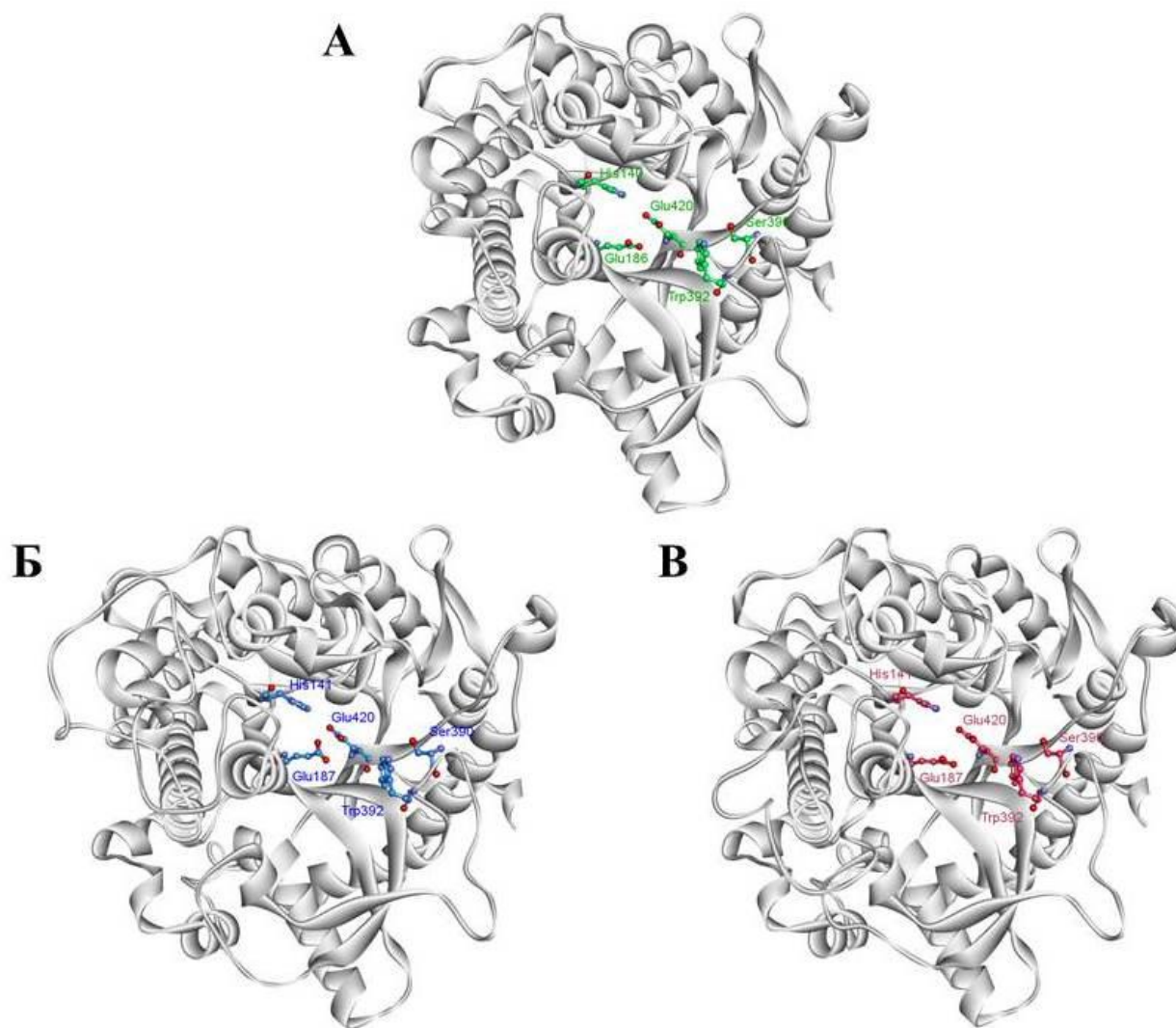


Слика 37. Хидролиза референтних једињења из групе β -D-глюкозида под дејством хетерологих ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2* (ДК, епидеоксилоганинска киселина; ЛОГ, логанин; СЛОГ, секологанин; СВ, сверозид; СВМ, сверцијамарин; ГП, генциопикрин; АП, апигетрин; ИК, изокверцитрин; ВТ, витексин). Скраћенице: К контрола; Р, реакциона смеша. Статистички значајна разлика према *t*-тесту означена је звездицама: * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$

4.3.4. Конструкција 3D модела ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2*

Конструисани су 3D модели ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2* на основу хомологије са 3D моделом ензима раукафрицин β -глюкозидаза (Слика 38 А) из врсте *R. serpentina* (енг. *PDB - Protein Data Bank: 4A3Y*) са којом *CeBGLU1* (Слика 38 Б) и *CeBGLU2* (Слика 38 В) показују највећи степен хомологије аминокиселинских секвенци.

Обележене глутаминске киселине (*Glu*) на позицијама 187 и 420 код ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2* одговарају глутаминским киселинама стриктозидин- β -D-глюкозидазе врсте *R. serpentina* које учествују у хидролизи молекула стриктозидина. Аминокиселине раукафрицин- O - β -D-глюкозидазе *R. serpentina* серин (*Ser*) (на позицији 390) и триптофан (*Trp*) (на позицији 392) одговорне су за облик активног места и одређују специфичност за супстрате стриктозидин и раукафрицин. Ове аминокиселине на истим позицијама аминокиселинског ланца присутне су и у ензимима *CeBGLU1* и *CeBGLU2*.



Слика 38. 3D модели ензима β -глюкозидаза. А. раукафрицин β -глюкозидаза из врсте *R. serpentina*. Б. β -глюкозидаза (*CeBGLU1*) врсте *C. erythraea*. В. β -глюкозидаза (*CeBGLU2*) врсте *C. erythraea*. Хомолого моделовање извршено је у програму *MODELLER*.

5. ДИСКУСИЈА

Врста *Centaurium erythraea* Rafn (Gentianaceae) као део одбрамбене стратегије продукује изразито горке секоиридоидне глукозиде који биљци обезбеђују континуирану и ефикасну заштиту од патогена и хербивора. Детерентно дејство различитих иридоидних глукозида биљног порекла је добро документовано, а показано је како на инсектима из групе сваштоједа генералиста, тако и на специјалистима (Kubo и сар. 1985; Bowers и Puttick, 1988; Puttick и Bowers, 1988; Marak и сар., 2002a, 2002b). Један од ефеката које патогени и хербивори изазивају код биљака јесте механичко оштећење листова, након чега бива активирана читава серија различитих механизма који за циљ имају залечење листова и превенцију даљих оштећења (León и сар., 2001; Savatin и сар., 2014). Исти одбрамбени механизми као у случају напада патогена и хербивора могу се активирати и као одговор на механичко оштећење ткива до кога у природним условима може доћи под утицајем великог броја абиотичких (ветар, олуја, јака киша) и биотичких фактора (нпр. антропогени утицај). Кичица расте на отвореним, често веома прометним и привременим стаништима као што су пашњаци, падине, обронци шума, путеви и стазе, али су ове биљке веома распрострањене и на различитим типовима деградираних станишта као што су канали, ободи новоизграђених путева, и сл. (Radušienė, 1995; Van Rossum, 2009). Поред тога, кичица је веома често изложена стресогеним факторима који доводе до механичких оштећења листова и стабала (нпр. кошење). Уочено је да у тим случајевима долази до стимулације латералног гранања и прерастања бочних изданака, као и до бројних промена у физиологији и биохемији биљака. Генерално, одговор на повређивање ткива јавља се како у оштећеним ткивима (локални одговор), тако и у неоштећеним деловима биљке (системски одговор) (León и сар., 2001; Malook и сар., 2019). Одговор отпочиње перцепцијом и трансдукцијом специфичних сигнала непосредно након оштећења ткива, што даље изазива промене у експресији великог броја гена (Jacobo-Velázquez и сар., 2015; De Bernonville и сар., 2017; Zhang и сар., 2019). До већине промена током одбрамбеног одговора биљке долази већ након неколико секунди или минута, а у неким случајевима је потребно и неколико сати (Delessert и сар., 2004; Zhang и сар., 2019). Експресија гена биосинтетског пута јасмонске киселине (JA), етилена (ET), као и оних гена који су укључени у одбрамбени одговор биљке на стресогене факторе је веома брзо иницирана (Reymond и сар., 2000; Delessert и сар., 2004; De Bernonville и сар., 2017). Нешто касније може се приметити прилагођавање нивоа експресије гена који кодирају за ензиме биосинтетских путева специјализованих метаболита (нпр. глукозинолата, алкалоида, фенолних једињења) паралелно са променама у примарном метаболизму биљака (Savatin и сар., 2014; Jacobo-Velázquez и сар., 2015; De Bernonville и сар., 2017).

Иако је кичица веома добро хемијски окарактерисана и нашироко су познати њени медицински и фармаколошки ефекти, оно што је велика непознаница јесте метаболизам секоиридоидних глукозида, његова екофизиолошка улога, као и регулација под утицајем срединских фактора. Ова докторска дисертација даје значајан допринос у разјашњавању наведених процеса, и по први пут објашњава улогу секоиридоидних глукозида и β -глукозидаза током одбрамбеног одговора кичице на стрес механичким повређивањем.

5.1. Предности извођења експеримената у контролисаним *in vitro* условима

Технологија културе биљака *in vitro* се данас користи како за истраживања биохемијских и физиолошких процеса у биљкама, тако и за продукцију биолошки активних једињења (Georgiev и сар., 2011). Истраживања спроведена на различитим биљним врстама су показала да се фармаколошки активне компоненте биљног метаболизма могу произвести у контролисаним условима културе *in vitro* (Predieri и Rapparini, 2007; Matkowski, 2008), а предности оваког алтернативног приступа су бројне. Гајење биљака у контролисаним условима превазилази сезонска ограничења присутна код природних популација. Такође, изолација специјализованих метаболита је лакша из ткива и ћелија гајених *in vitro* у поређењу са биљкама које су узете из природе (Verpoorte и сар., 2002). Међутим, индустријска производња специјализованих метаболита у култури *in vitro* је, поред свих наведених предности и бројних истраживања у области, веома ретко комерцијализована. Изузетак су производња таксола у ћелијској култури врста рода *Taxus* и шикинона, путем ћелијске културе врсте *Lithospermum erythrorhizon* (Zhao и сар., 2005).

Врста *C. erythraea* је, због лековитих својстава које поседује, популарна у народној медицини многих земаља. Услед прекомерне експлоатације из природних ресурса налази се на листи заштићених биљних врста у многим европским земљама. Технике културе биљних ћелија, ткива и органа *in vitro* су се наметнуле као алтернатива за обезбеђивање биљног материјала за потребе изолације биоактивних једињења ове врсте. Многобројна истраживања су показала да је кичица способна да у условима *in vitro* продукује специјализоване метаболите на нивоу истом или сличном као биљке из природе, а у неким случајевима чак и интензивније (Piatczak и сар., 2005; Boroduske и сар., 2016). Осим тога, кичица се одликује високим регенеративним потенцијалом у култури *in vitro* што омогућава брзу и ефикасну пропацију (Subotić и Grubišić, 2007; Trifunović-Momčilov и сар., 2016). У литератури је показано да коренови, листови, али и калуси кичице показују способност регенерације пупољака (Piatczak и Wysokińska, 2003). Соматска ембриогенеза и органогенеза пупољака се може постићи спонтано у култури коренова кичице на *MS* хранљивој подлози без додатка регулатора растења (Subotić и Grubišić, 2007; Filipović и сар., 2019) што је био основни приступ и приликом обезбеђивања материјала за извођење експеримената у оквиру ове докторске дисертације. Matekalo и сарадници (2018) су показали да постоји велика варијабилност у садржају специјализованих метаболита између генотипова кичице гајених у контролисаним условима, а да ова варијабилност у великој мери зависи од нивоа експресије биосинтетских гена. Како би се искључила могућност утицаја генотипа на фенотипску варијабилност у експериментима је коришћен униформни генетички материјал. Након иницијалног проверавања садржаја секоиридоида код десет генотипова одабран је један високопродуктиван генотип (П1) који је потом клонално умножен посредством течне културе коренова. Спонтано формиран пупољци су одвојени са коренова и ожиљени на $\frac{1}{2}$ *MS* чврстој хранљивој подлози без додатка регулатора растења. Након три месеца гајења добијен је генетички униформан биљни материјал, уједначен у погледу стадијума развића, који је коришћен у експериментима. Извођење експеримената повређивања листова кичице у условима *in vitro* има бројне предности. Између осталог, обезбеђени су контролисани услови гајења, као што су температура, светлосни режим, влажност ваздуха, физичко-хемијски састав хранљиве подлоге и др. На овај начин било је могуће праћење промена у специјализованом метаболизму које су изазване искључиво механичким оштећењем ткива листова. Овакав тип експеримената тешко је извести у природним условима услед варирања великог броја абиотичких и биотичких фактора спољашње средине.

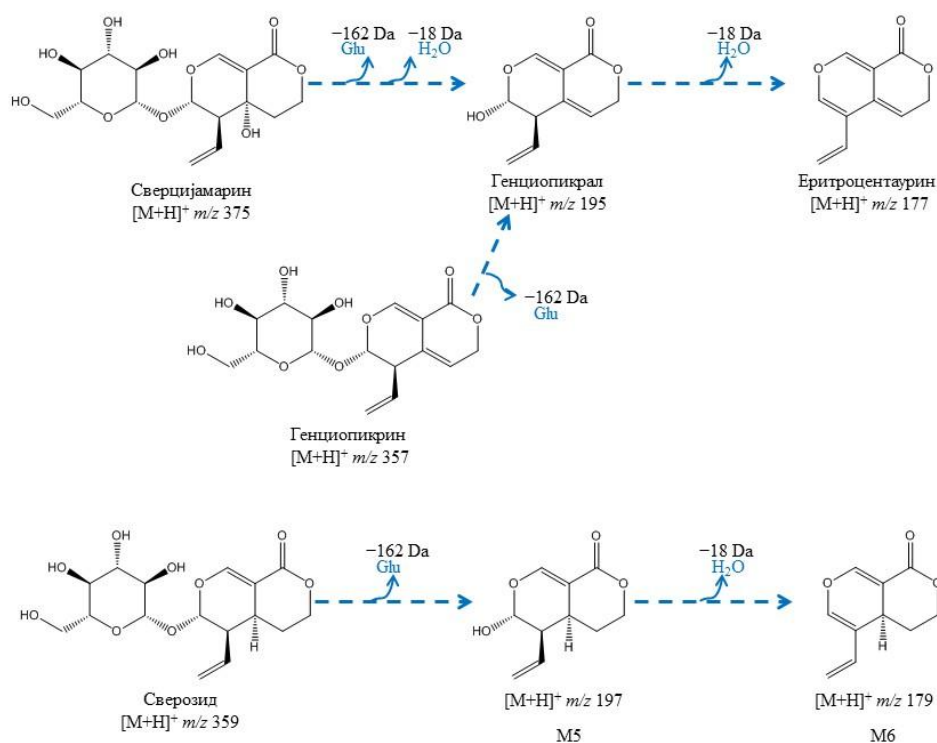
5.2. Аналитичке методе за идентификацију и квантификацију секоиридоидних глукозида и њихових агликона

Лековита својства кичице се приписују фармаколошки активним специјализованим метаболитима, као што су фенолне киселине, флавоноиди и, у највећој мери, секоиридоиди. Према подацима које су објавили *Jensen* и *Schripsema* (2002) код 127 врста из фамилије *Gentianaceae* потврђено је присуство укупно 90 секоиридоидних глукозида, при чему СВ, СВМ и ГП представљају најзаступљенија једињења из наведене групе. Из литературе је познато да ова једињења, као и β -глукозиди неких других класа специјализованих метаболита, подлежу хидролизи посредством β -глукозидаза при чему настају нестабилни и врло реактивни агликони. Они су ретко детектовани у биљкама, како због њиховог веома ниског садржаја који је вероватно последица нестабилности и даљег метаболисања од стране биљке, тако и због нивоа осетљивости примењених аналитичких метода. За истраживања у оквиру ове докторске дисертације било је од значаја развити и верификовати аналитичке методе за идентификацију и квантификацију иридоида и секоиридоидних глукозида, као и њихових агликона. У складу са тим био је неопходан биљни материјал који садржи глукозиде и агликоне секоиридоида, што је обезбеђено ензиматском хидролизом метанолних екстраката кичице и стандарда СВ и СВМ коришћењем комерцијалне β -глукозидазе пореклом из бадема.

Резултати добијени на основу квалитативне *UHPLC/Orbitrap-MS* анализе хидролизованых (ХМЕ) и нехидролизованых метанолних екстраката кичице (МЕ) показали су да су једињења идентификована у узорцима *C. erythraea* углавном позната у литератури (*Valentão* и сар., 2001; *Kulevanova* и сар., 2003; *Marchyshyn* и *Stoyko*, 2014; *Stefkov* и сар., 2014; *Banjanac* и сар., 2017; *Dorđević* и сар., 2017). Изузетак су једињења секологанозид, кафеоил б'-секологанозид, ферулоил б'-секологанозид и *p*-кумароил б'-секологанозид која су у овом истраживању први пут забележена у екстрактима *C. erythraea*, али су позната у литератури као продукти метаболизма других врста које синтетишу иридоиде (*Innocenti* и сар., 2006; *Obied* и сар., 2007; *Li* и сар., 2015). Секологанозид је у екстрактима кичице детектован на основу *MS* фрагментације коју су описали *Li* и сарадници (2015). Присуство *p*-кумароил б'-секологанозида је потврђено на основу *MS* фрагментације коју су у претходним истраживањима описали *Obied* и сарадници (2007). Присуство СВ, СВМ и ГП у МЕ и ХМЕ кичице потврђено је коришћењем стандарда, а јони ових једињења су видљиви као адукти сирћетне киселине у негативном јонизационом режиму $[M-H^+CH_3COOH]^-$, као што су претходно описали *Banjanac* и сарадници (2017). ЛК је идентификована као молекуларни јон $[M-H]^-$ на 375 *m/z* поређењем са стандардом и на основу фрагментације коју су описали *Kucharska* и *Fecka* (2016).

UHPLC-MS/MS /Orbitrap анализа је указала да ензиматска хидролиза екстракта генерално доводи до промена у количини β -*D*-глукозида флавоноида и секоиридоида, а самим тим и до варирања у садржају одговарајућих агликона. Уочене разлике у садржају секоиридоидних глукозида између МЕ и ХМЕ су последица активности ензима β -глукозидазе, тј. њихове хидролизе, па је заступљеност ових једињења у ХМЕ, очекивано, била много нижа него у МЕ. Познато је, на основу литературних података, да ензими β -глукозидазе хидролизују β -*D*-глукозиде и делимично β -*D*-глукурониде и β -*D*-галактозиде, али не показују хидролитичку активност према *O*-диглукозидима, као што су рамноглукозиди и (1-2) диглукозиди (*Soković* и сар., 2000). На основу добијених резултата уочено је да поједини глукозиди флавоноида, попут глукозида кверцетина и глукозида лутеолина, такође подлежу ензиматској хидролизи, што је потврђено чињеницом да је дошло до пораста количине њихових агликона- кверцетина и лутеолина у ХМЕ.

UHPLC/DAD/(-)HESI-MS/MS метода је коришћена за квантификацију секоиридоида и њихових агликона у узорцима кичице. Као продукти деглукозилације ГП идентификовани су ГЛ и ЕР, што је у складу са подацима из литературе. На основу резултата *Zeng* и сарадника (2013) ГЛ и ЕР се формирају преко два изомеризациона пута хемиацеталног дела агликона. *Wang* и сарадници (2009) су показали да трансформација ГП под дејством β -глукозидазе доводи до формирања два продукта: ЕР и 5,6-дихидро-5-формил-6-метил-1*H*,3*H*-пирано[3,4-*c*]пиран-1-она, док су *Ishiguro* и сарадници (1983) показали да као производ у реакцији ензиматске хидролизе ГП настаје ГЛ. Резултати приказани у овој дисертацији указују да се СВМ, након ензиматске хидролизе комерцијалном β -глукозидазом, такође конвертује у ГЛ и ЕР, што је у складу са подацима из литературе (*El-Sedawy* и сар., 1989b; *Zeng* и сар., 2013). Наукледал и епинаукледал могу бити продукти ензиматске хидролизе СВ (*El-Sedawy* и сар., 1990). Постоји претпоставка да се наведена два једињења налазе међу продукцима ензиматске хидролизе СВ, али то није потврђено аналитичким методама које су коришћене у овој докторској дисертацији услед недостатка стандарда, као и масених података у литератури. Због тога су ова два једињења означена као *M5* и *M6*. Хипотетички пут фрагментације СВ, СВМ и ГП након ензиматске хидролизе β -глукозидазом приказан је на Слици 39.



Слика 39. Схематски приказ хипотетичког пута MS^2 фрагментације сверцијамарина, генциопикрина и сверозида под дејством ензима β -глукозидазе.

UHPLC/DAD/(+)HESI-MS/MS карактеризација и/или квантификација стандарда секоиридоидних глукозида и њихових агликона како у МЕ, тако и у ХМЕ, јасно је указала да су доминантни агликон ГЛ и ЕР заправо идентични продукцима који су детектовани након хидролизе стандарда СВМ. Резултати такође указују да комерцијална β -глукозидаза показује већу специфичност за СВ као супстрат него за ГП и СВМ.

Резултати добијени у оквиру ове дисертације су у складу са претходним истраживањима (*Ishiguro* и сар., 1986; *El-Sedawy* и сар., 1989а; 1989б, 1990; *Zeng* и сар., 2013) која су указала да ензиматска хидролиза секоиридоидних глукозида доводи до продукције интермедијера агликона који се даље конвертују у биоактивне метаболите кроз реакције изомеризације, редукције и оксидације. У *in vivo* модел систему у коме је хранљива подлога за гајење микрогљиве *P. funiculosum* била снабдевена екстрактом кичице забележено је значајно опадање садржаја СВМ, ГП и СВ у подлози, што је указало на активно усвајање ових једињења и њихово метаболисање од стране гљива. Интресантно, одговарајући агликони нису регистровани у хранљивим подлогама и у гљивама што је указало на њихову активну разградњу. Наравно, не треба занемарити могућност да су ова једињења присутна, али у количинама нижим од граница осетљивости коришћених аналитичких метода. Слично објашњење могло би да важи и у случају анализираних јединки кичице у експерименту повређивања листова код којих агликони секоиридоидних глукозида нису регистровани.

5.3. Биолошка активност екстраката *C. erythraea* и секоиридоидних глукозида као резултат активности β -глукозидазе

Познато је да ензиматска хидролиза специјализованих метаболита биљака мења њихову хемијску структуру, па самим тим значајно утиче и на њихову биолошку активност (*Fleming* и сар., 1973; *Schönbeck* и *Schlösser*, 1976; *Kubo* и сар., 1985; *Hammerschmidt* и *Schultz*, 1996; *Soković* и сар., 2000). Секоиридоиди, главни продукти специјализованог метаболизма кичице, у литератури су познати као једињења која испољавају различите биолошке активности (*Petkov* и *Manolov*, 1978; *Ishiguro* и сар., 1986; *Chang*, 1997; *Ghisalberti*, 1998; *Jaishree* и сар., 2009; *Vaidya* и сар., 2009, 2013; *Šiler* и сар., 2010; *Ahamad* и сар., 2016; *Huang* и сар., 2016; *Zhou* и сар., 2019; *Vaijanathappa* и сар., 2020). Показано је да одређене биолошке активности ових једињења потичу од агликона који настају након хидролизе ензимом β -глукозидазом (*Konno* и сар., 1999; *Vaidya* и сар., 2013; *Zeng* и сар., 2013; *Koudounas* и сар., 2015; *Wenjin* и *Jianwei*, 2017).

Антиоксидативни потенцијал кичице описали су *Valentão* и сарадници (2001), *Sefi* и сарадници (2011), као и *Šiler* и сарадници (2014). У оквиру ове дисертације испитана је антиоксидативна активност екстраката кичице и стандарда секоиридоида (као доминантних продуката секундарног метаболизма ове врсте) пре и након ензиматске хидролизе комерцијалном β -глукозидазом из бадема. Резултати добијени овим анализама указали су на делимично повишен антиоксидативни потенцијал секоиридоидних глукозида након њихове хидролизе.

Три *in vitro* методе (*DPPH*, *ABTS* и *FRAP*) које су у овом раду примењене за процену нивоа антиоксидативне активности референтних једињења и биљних екстраката често су у употреби због једноставности извођења и високе осетљивости. Наведене методе се заснивају на различитим принципима, али се у основи базирају на мерењу капацитета антиоксиданаса да редукују једињење које притом мења боју, при чему је степен промене боје у корелацији са концентрацијом антиоксиданаса у узорку. Свака од наведених метода има своје предности, али и недостатке. Метода неутрализације *ABTS* радикала може се користити за мерење антиоксидативне активности хидрофилних и липофилних компоненти док, са друге стране, *DPPH* метода због нерастворљивости главне компоненте у води није адекватна за одређивање антиоксидативног потенцијала хидрофилних једињења (*Wojdyło* и сар., 2007). Због наведених недостатака појединачних тестова, као и због комплексне природе биљних

екстракта увек је боље користити више од једне методе за мерење антиоксидативног капацитета испитиваног узорка (*Katalinic* и сар., 2006; *Salazar* и сар., 2008).

Главне компоненте специјализованог метаболизма кичице, секоиридоиди СВ, СВМ и ГП, нису показале значајан антиоксидативни потенцијал приликом коришћења *DPPH* и *FRAP* тестова (*Šiler* и сар., 2014). Резултати *ABTS* теста изведеног у *in vitro* условима су показали да СВМ у извесној мери испољава антиоксидативни потенцијал, што је у складу са претходним истраживањима *Vaijanathappa* и *Badami* (2009). Поред тога, показано је да у *ABTS* тесту ХМЕ и хидролизоване облици секоиридоидних глукозида имају значајнији антиоксидативни потенцијал од одговарајућих нехидролованих облика. Ефикасније уклањање *ABTS* радикала од стране агликона секоиридоида може бити последица њихове хемијске природе, односно веће поларности агликона у односу на одговарајуће глукозиде секоиридоида. Са друге стране, нижи антиоксидативни потенцијал тестираних узорака показан *DPPH* методом може бити резултат нижег афинитета секоиридоидних глукозида према *DPPH* радикалу у односу на *ABTS* радикал (*Šiler* и сар., 2014). На већи антиоксидативни потенцијал ХМЕ у односу на МЕ значајно може утицати присуство флавоноида у екстракту, као што су лутеолин, кверцетин и камферол, који, као што је показано хемијским анализама, такође подлежу ензиматској хидролизи при чему настају реактивни агликони.

Интересантно је да МЕ и ХМЕ испољавају јачи антиоксидативни капацитет у поређењу са стандардима секоиридоида, било да су хидроловани или не, осим у случају хидролованог ГП. Тако су вредности антиоксидативног потенцијала хидролованог облика ГП добијене помоћу *ABTS* теста приближно једнаке антиоксидативним вредностима МЕ. Већа антиоксидативна активност МЕ и ХМЕ у односу на чисте секоиридоиде је највероватније резултат синергистичког дејства секоиридоида и других фенолних једињења (укључујући фенолне киселине, флавоноиде и ксантоне) која такође представљају продукте специјализованог метаболизма кичице. Због хемијске структуре која се заснива на ароматичном прстену за који су везане једна или више хидроксилних група, ова једињења имају способност неутрализације слободних радикала. Врста *C. erythraea* синтетише фенолна једињења попут кверцетина, камферола, лутеолина, кумарне и кофеинске киселине, која су у литератури позната као добри антиоксиданси (*Rice-Evans* и сар., 1996; *Re* и сар., 1999).

Резултати бројних истраживања су показали да неки иридоидни глукозиди у присуству биљних β -глукозидаза ослобађају реактивне агликоне који имају снажан антимикуробни ефекат (*Ishiguro* и сар., 1982; *Marak* и сар., 2002b). СВ и СВМ су секоиридоиди који поседују висок антимикуробни потенцијал (*Kumarasamy* и сар., 2003; *Šiler* и сар., 2010). Према резултатима *Ishiguro* и сарадника (1982) и *Van Der Sluis* и сарадника (1983, 1983a) агликони секоиридоида СВ, СВМ и ГП поседују значајну антимикуробну активност. Заправо, бројне студије указују на значајан антимикуробни ефекат иридоидних глукозида након дејства β -глукозидаза (*Rombouts* и *Links*, 1956; *Ishiguro* и сар., 1982; *Van Der Sluis* и сар., 1983; *Stermitz*, 1988; *Marak* и сар., 2002b), што наводи на претпоставку да антимикуробни ефекат ових једињења у великој мери зависи од присуства одговарајућих агликона. Тако је испитивање фунгитоксичног ефекта СВ, СВМ и ГП које су спровели *Van Der Sluis* и сарадници (1983), показало да ови глукозиди нису токсични за сој *Penicillium expansum*. Ипак, у присуству β -глукозидазе ГП инхибира раст наведеног соја гљива, па је описани ефекат приписан деловању одговарајућег агликона ГП. Поред тога, СВ, СВМ и ГП показују и значајно антибактеријско дејство према соју *Staphylococcus aureus* у присуству β -глукозидазе (*Ishiguro* и сар., 1982). Трансформацијом секоиридоидних глукозида у условима *in vivo* настају метаболити који поседују значајан фармаколошки потенцијал (*Luo* и сар., 2009; *Han* и сар., 2014).

У оквиру ове дисертације антимикуробна активност је испитивана на различитим микроорганизмима од којих неки попут *E. coli*, *S. aureus* и *L. monocytogenes* припадају групи патогена који се преносе храном и могу изазвати фаталне инфекције код људи и животиња. Са друге стране, бројне врсте које припадају родовима *Aspergillus* и *Penicillium* имају кључну улогу у биотехнологији због способности биодеградације, биосорпције тешких метала, биотрансформације отпадних вода, итд. Резултати испитивања антимикуробне активности хидролизованых или нехидролизованых екстраката и секоиридоида варирали су у зависности од тестираног микроорганизма. Тако су екстракти кичице (МЕ и ХМЕ) показали снажну антимикуробну активност против свих тестираных микрорганизама, и то сличну онима коју имају комерцијални фунгициди (кетоконазол и бифоназол) и антибиотици (стрептомицин и ампицилин). Посебно је значајан податак да је активност екстраката према неким од тестираных сојева микроорганиза била значајно већа у односу на одговарајућа референтна једињења. Екстракти кичице су били посебно ефикасни против сојева *P. funiculosum*, *P. ochrocloron* и *P. verrucosum* var. *cyclopium*. Међутим, и поред тога што су екстракти и стандарди секоиридоидних глукозида пре и након ензиматске хидролизе показали извесне разлике у антимикуробној активности, јасан тренд или правилност није могуће утврдити. Антимикуробна активност СВМ и СВ је била значајно већа од комерцијално доступних антибиотика и фунгицида, што је у складу са резултатима из претходних студија (Kumarasamy и сар., 2003; Siler и сар., 2010).

На основу добијених резултата може се закључити да екстракти *C. erythraea*, као и главни продукти специјализованог метаболизма ове врсте, могу бити ефикасни у третману поремећаја и/или болести које изазивају поменути патогени, некада и ефикаснији него комерцијални лекови. У складу са тим, врсте које продукују секоиридоиде, укључујући и *C. erythraea*, могу се користити за третман интестиналних тегоба чији су узрочници патогени као што су *E. coli*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp. и *Aspergillus* spp. Резултати добијени током израде ове дисертације, као и резултати претходних истраживања (Luo и сар., 2009; Han и сар., 2014; Zeng и сар., 2014), могу представљати основу за спровођење клиничких студија о употреби екстраката *C. erythraea* и секоиридоидних глукозида у лечењу појединих болести изазваних патогеним микроорганизмима, а у циљу имплементације ових природних производа у хуманој медицини.

Ефекат хидролизе секоиридоидних глукозида и екстраката кичице на њихов антиоксидативни и антимикуробни потенцијал поред испитивања у *in vitro* ензимским тестовима упоредо је праћен и у *in vivo* модел-систему (*Penicillium funiculosum*). Резултати истраживања су јасно показали да *P. funiculosum* ефикасно метаболише три секоиридоидна глукозида из екстраката *C. erythraea* што је довело до постепеног опадања концентрације глукозида у хранљивој подлози након 3 и 6 дана култивације. Ранија истраживања на соју *P. funiculosum* су показала да ова микрогљива продукује екстрацелуларне β -глукозидазе (Lachke и сар., 1983; Kantham, 1985; De Castro и сар., 2010). Тако сој *P. funiculosum* NCL1 производи најмање пет различитих изоформи β -глукозидаза од којих су BGL3 и BGL4 пречишћене и функционално окарактерисане на великом броју супстрата (Ramani и сар., 2012, 2014). Литературни подаци (El-Sedawy и сар., 1989a, 1989b, 1990; Setchell, 2000; Otieno и Shah, 2007) потврђују да многи микроорганизми имају способност хидролизе иридоидних глукозида. Тако су СВ, СВМ и ГП ефикасно трансформисани различитим сојевима бактерија и микрогљива (El-Sedawy и сар., 1989a, 1989b, 1990; Jun и сар., 2008; Wang и сар., 2009; Zeng и сар., 2014). Као последица биотрансформације ГП ендифитном гљивом *Penicillium crustosum* настаје пет различитих продуката хидролизе (Zeng и сар., 2014). Према резултатима Wang и сарадника (2009) мицелија *Cordiceps sinensis* трансформише ГП, при чему настаје монотерпеноидни алкалоид (Z)-5-етилиден-8-хидрокси-3,4,5,6,7,8-хексахидропирано[3,4-c]пиридон-1-он, док сој *Aspergillus niger* трансформише СВМ у реакцији у којој настају EP и

(Z)-5-етилиден-8-хидрокси-3,4,5,6,7,8-хексахидро-1H-пирано[3,4-с]пиридин-1-он (Jun и сар., 2008). Хумане интестиналне бактерије ефикасно метаболишу СВ, СВМ и ГП који је изолован из биљне врсте *Swertia japonica*, што су у својим радовима показали *El-Sedawy* и сарадници (1989a, 1989b, 1990). Према наведеним истраживањима метаболичка конверзија секоиридоидних глукозида почиње ензиматском хидролизом супстрата под дејством β -глукозидаза. Након трансформације секоиридоидних глукозида у тестираним узорцима су детектовани метаболити ГП, као што су ЕР, ГЛ, 5-хидроксиметилсокромен-1-он и 5-хидроксиметилсокроман-1-он (*El-Sedawy* и сар., 1989a). Интестиналне бактерије трансформишу СВМ у реакцији у којој настају 5-хидроксиметилсокроман-1-он и азотно једињење генцианин (*El-Sedawy* и сар., 1989b; *Tian* и сар., 2017). Према резултатима *El-Sedawy* и сарадника (1990) бактеријски сој *Proteus mirabilis* у анаеробним условима ефикасно метаболише СВ, при чему настају агликони СВ и 4,4 β -5 α ,6 α -тетрахидро-5 β -хидроксиметил-6 β -метил-1H,3H-пирано(3,4-с)пиран-1-он. На основу резултата истраживања које су спровели *Marak* и сарадници (2002) сматра се да заправо иридоидни глукозиди могу послужити као извор угљеника биотрофним патогенима. Наведени подаци су у складу са резултатима добијеним у оквиру ове дисертације који указују да *P. funiculosum* може ефикасно да користи секоиридоидне кичице као извор угљеника и енергије када су они у подлози присутни у сублеталним концентрацијама. У прилог томе говори и чињеница да у хранљивим подлогама за гајење гљива у којима је регистровано опадање количине секоиридоидних глукозида кичице није забележено присуство одговарајућих агликона. Разлог може бити ефикасна даља конверзија агликона од стране гљива, мада се не сме искључити могућност да примењене аналитичке методе нису биле довољно осетљиве. Ови резултати су изузетно значајни, имајући у виду чињеницу да *Centaurii herba* испуњава захтеве Директиве 2004/24 ЕС по којој се може класификовати као традиционални биљни лек (Европска агенција за лекове, 2015), а да се такође препоручује и као моћан адитив за чување хране (*Šiler* и сар., 2014). Како је сублетална доза секоиридоидних глукозида различита код различитих врста и сојева микроорганизама, од суштинске је важности да се утврде тачне количине и дозе за клиничку примену ових једињења. Примењени секоиридоиди са једне стране не би требало негативно да делују на цревну флору домаћина, али ни да подстичу раст патогених микроорганизама ако се примењују у сублеталној концентрацији.

5.4. Промене у метаболизму секоиридоидних глукозида у листовима *S. erythraea* изазване механичким повређивањем ткива

Једна од главних улога специјализованих метаболита у самој биљци јесте учешће у интеракцијама биљке са околином (*Verpoorte* и сар., 2002). Када се нађу у стресним условима биљке могу да искористе ресурсе примарног метаболизма и усмере их ка синтези компоненти неопходних за одбрамбени одговор, односно, ка специјализованом метаболизму (*Mortensen* и сар., 2019). Биосинтеза специјализованих метаболита може бити регулисана спољашњим стимулусом или дејством елицитора, као што су салицилна киселина или јасмонати (*Singh* и сар., 2018). Једињења која су део хемијске одбране биљака се појачано синтетишу у листовима, нарочито у младим, који су обично и делови биљке најизложенији нападу патогена и хербивора. Ранија истраживања су показала да повреда ткива активира одбрамбени одговор многих биљних врста који подразумева појачану синтезу специјализованих метаболита (*Darrow* и *Bowers*, 1999; *De Bernonville* и сар., 2017; *Meelaph* и сар., 2018; *Ibanez* и сар., 2019). Претпоставља се да у природним условима, након напада патогена и хербивора који оштећују ткиво биљака, долази до хидролизе глукозида

посредством ендегених β -глукозидаза саме биљке, али и хидролитичких ензима пореклом од патогена и хербивора. Активација секоиридоида под дејством ензима β -глукозидазе у самој биљци представља један од начина хемијске заштите биљке од напада патогена и хербивора (Ahn и сар., 2010; Pankoke и сар., 2013, 2015). Из литературе је познато да стрес повређивањем ткива и примена *MeJA* може довести до индукције биосинтезе секоиридоида код врста фамилије *Gentianaceae* (Darrow и Bowers, 1999; Reymond и сар., 2000; Jacobo-Velázquez и сар., 2015; Goossens и сар., 2016; Meelaph и сар., 2018).

Продукција специјализованих метаболита поред осталих ендегених фактора, зависи и од генотипа биљке. *Matekalo* и сарадници (2018) су показали да продукција секоиридоида код кичице зависи од генотипа, па је могуће раздвојити високопродуктивне од нископродуктивних генотипова. Капацитет генотипова за продукцију секоиридоида је регулисан на нивоу транскрипције биосинтетских гена. Услед тога је у експериментима коришћен униформни генетички материјал који је клонално умножен. Како би био избегнут евентуални утицај стадијума развића листова на садржај секоиридоида, повреда је индукована увек на истом пару листова. Секоиридоиди се, иначе, код врста из фамилије *Gentianaceae* акумулирају у различитим деловима биљке. Код врсте *Swertia chirayita*, као и врста из рода *Gentiana*, секоиридоиди се акумулирају у кореновима (Cao и сар., 2012; Padhan и сар., 2015), док се код неких других врста из истог рода, укључујући и врсту *C. erythraea*, секоиридоиди углавном складиште у надземним деловима биљке (Šiler и сар., 2012; Liu и сар., 2017; *Matekalo* и сар., 2018). Садржај секоиридоидних глукозида у листовима кичице не зависи значајно од развојног стадијума листа (*Matekalo* и сар., 2018), али може варирати у зависности од бројних ендегених и срединских фактора (Boroduske, 2016; *Matekalo* и сар., 2018).

У циљу расветљавања путева биосинтезе и разградње секоиридоидних глукозида кичице током физиолошког одговора на стрес изазван повређивањем ткива испитане су промене на метаболичком нивоу (профилисање секоиридоидних глукозида и осталих интермедијера биосинтетског пута), као и промене на молекуларном нивоу, при чему је праћена експресија гена укључених у биосинтетски пут секоиридоида, као и гена за β -глукозидазу. Истраживања на врстама рода *Plantago* (Pankoke и сар., 2013) су показала да иридоидни глукозиди и ензим β -глукозидаза формирају двојни одбрамбени одговор биљке на напад неадаптираних хербивора. Такође, неке од одбрамбених компоненти врсте *C. roseus*, као што су индолни алкалоиди, могу бити хемијски неактивне форме једињења које се ензиматски активирају након оштећења ткива, при чему се ослобађају реактивни и токсични агликони (Guirimand и сар., 2010). Биосинтетски пут секоиридоидних глукозида кичице одвија се посредством СЛОГ, који је такође прекурсор синтезе великог броја индолних алкалоида (*St-Pierre* и сар., 2013). Повлачењем паралеле са биосинтетским путем алкалоида код врсте *C. roseus* (Miettinen и сар., 2014) недавно су код кичице идентификовани гени кандидати биосинтетског пута секоиридоида до СЛОГ (*Matekalo* и сар., 2018). Комплетан биосинтетски пут који води до СВ, СВМ и ГП до сада није описан код врста рода *Centaurium*, као ни код других сродних врста из фамилије *Gentianaceae*. Поред тога, у литератури нема података о катаболизму СВ, СВМ и ГП код кичице. Једна од полазних хипотеза ове докторске дисертације била је да први корак у разградњи секоиридоидних глукозида код кичице представља хидролиза секоиридоида посредством ензима β -глукозидазе који показује високу специфичност за ова једињења.

Бројна истраживања на биљци *C. roseus* су показала да повреда ткива до које долази након напада хербивора може да индукује појачану експресију гена биосинтетског пута монотерпеноидних индолних алкалоида (*MIA*) у листовима, што доводи до интензивније биосинтезе ових једињења (Vázquez-Flota и сар., 2004; De Bernonville и сар., 2017; Nishanth и

сар., 2018). Повреда утиче на појачану синтезу стриктозидина у локалним листовима након 48 h и 72 h, док се виндорозин, ајмалицин и серпентин акумулирају 72 h након повреде у локалним (повређеним), али и у дисталним (неповређеним) листовима (*De Bernonville* и сар., 2017). *Vazquez-Flota* и сарадници (2004) су показали да повреда котиледона *C. roseus* утиче на појачану акумулацију ајмалицина и виндолина након 12 h. Садржај бензил изоквинолних алкалоида нуциферина и *N*-норнуциферина расте 72 h након механичке повреде листових лотоса (*Meelaph* и сар., 2018). Према резултатима *Alves* и сарадника (2007) повреда утиче на појачану синтезу тропанског алкалоида скополамина врсте *Brugmansia suaveolens*, па су максималне концентрације скополамина забележене 24 h након повреде. Појачана акумулација секоиридоидних глукозида у листовима кичице након њиховог повређивања у складу је са претходно наведеним истраживањима. Акумулација ЛОГ, СВМ и ГП започиње већ 2 h или 4 h након повреде, док се ЛК, СЛОГ и СВ акумулирају нешто касније (после 16 h и 24 h). Максимална акумулација укупних иридоида забележена је 96 h након повреде и то у целим листовима. Имајући у виду да је код биљака из фамилије *Gentianaceae* СВ прекурсор синтезе осталих секоиридоида у биосинтетском путу (*Inouye*, 1970), доминантна синтеза СВ у листовима након повреде је очекивана. Акумулација секоиридоида у повређеним и у целим (неповређеним) листовима кичице подржава хипотезу да се сигнал о оштећењу ткива шири кроз целу биљку, након чега се и у дисталним ткивима активирају одговарајући одбрамбени механизми (*Leon* и сар., 2001; *Toyota* и сар., 2018).

Продукција и акумулација специјализованих метаболита је уско повезана са експресијом гена укључених у биосинтезу ових једињења. Тако је експресија биосинтетских гена *CeGPPS*, *CeGES*, *CeG8O*, *Ce8HGO*, *CeIS*, *CeIO*, *Ce7DLGT*, *Ce7DLH2*, *CeLAMT* и *CeSLS* у корелацији са садржајем иридоида у различитим органима и зависи од генотипа биљке (*Matekalo* и сар., 2018). Механичко повређивање листових кичице индукује промене у експресији биосинтетских гена и на тај начин подстиче синтезу и акумулацију секоиридоидних глукозида. Резултати анализе експресије гена који су укључени у биосинтетски пут секоиридоида кичице су указали да повреда утиче на повећање експресије већине анализираних биосинтетских гена (*CeGPPS*, *CeGES*, *CeG8O*, *Ce8HGO*, *CeIS2*, *CeIO*, *Ce7DLGT*, *Ce7DLH2*, *CeLAMT* и *CeSLS*), са изузетком гена *CeIS1*. Тренд повећања нивоа експресије ових биосинтетских гена се уочава како у повређеним, тако и у неповређеним (целим) листовима кичице. Претходна истраживања су показала да код врсте *C. roseus* ген за иридоид синтазу (*CrIS*) има сличан образац експресије као и други гени биосинтетског пута *MIA*, док гени за прогестерон-5- β -редуктазу (*CrP5BR*) не прате овај тренд (*Munkert* и сар., 2015; *Kidd* и сар., 2019). Филогенетска упоредна анализа аминокиселинске секвенце *CeIS1* и *CeIS2* са неким окарактерисаним иридоид синтазама и прогестерон-5- β -редуктазама указала је на сродност *CeIS1* са прогестерон-5- β -редуктазама, док се *CeIS2* сврстава у групу са иридоид синтазама (Слика П3 и Табела П3 у Прилогу). Сличност *CeIS2* са иридоид синтазом *C. roseus*, као и сличан образац промене експресије након повреде, указују на регулаторну улогу овог гена у метаболичком путу секоиридоидних глукозида. Међутим, иако експресија *CeIS1* није индукована повредом или *MeJA*, значај *CeIS1* у биосинтетском путу секоиридоида се не сме потпуно искључити.

Анализа експресије гена кандидата који су укључени у биосинтетски пут секоиридоида указала је и да се ниво експресије готово свих анализираних биосинтетских гена повећава 24 h након повреде, осим у случају гена *CeGPPS*. Овај ген кодира за ензим који катализује прву реакцију у биосинтетском путу секоиридоида у којој се од *DMAPP* и *IPP* синтетише геранил дифосфат (*GPP*), а до повећања његове експресије долази 2 h и 4 h након повреде. Са друге стране, експресија гена *CeLAMT* је била испод нивоа детекције. Ниво експресије свих осталих испитиваних гена (*CeGES*, *CeG8O*, *Ce8HGO*, *CeIS2*, *CeIO*, *Ce7DLGT*, *Ce7DLH2* и *CeSLS*) се након повреде повећава и достиже максималне вредности након 24 h или 48 h, при

чему нису уочене статистички значајне разлике између повређених и неповређених листова кичице. Ово повећање релативне експресије биосинтетских гена је у складу са уоченим повећањем садржаја укупних иридоида (првенствено секоиридоида) у листовима кичице. Детаљном анализом профила експресије биосинтетских гена издвојен је ген *CeSLS*, чија је експресија повећана чак 800 пута и то 48 h након повреде листова. *De Bernonville* и сарадници (2016) су показали да повреда настала нападом хербивора или механичким оштећењем изазива значајан пораст експресије *SLS* и *LAMT* гена код врсте *C. roseus* после 6 h, 8 h и 24 h. Истовремено, експресија гена који су повезани са почетним корацима биосинтетског пута није показала тако висок степен индукције након повреде (*De Bernonville* и сар., 2016). Према резултатима *Dutta* и сарадника (2007) механичко повређивање листова *C. roseus* је такође довело до значајног повећања нивоа експресије гена *SLS* и то 6 h након повређивања приближно 50 % ламине листа. Са друге стране, *Nishanth* и сарадници (2018) су показали да повређивање листова *C. roseus* хирушким скалпелом индукује повећање експресије овог гена након 24 h. Механичка повреда, као и третман *MeJA* и салицилном киселином повећавају експресију гена *SLS* и у листовима врсте *Nothapodytes nimmoniana* (*Rather* и сар., 2019).

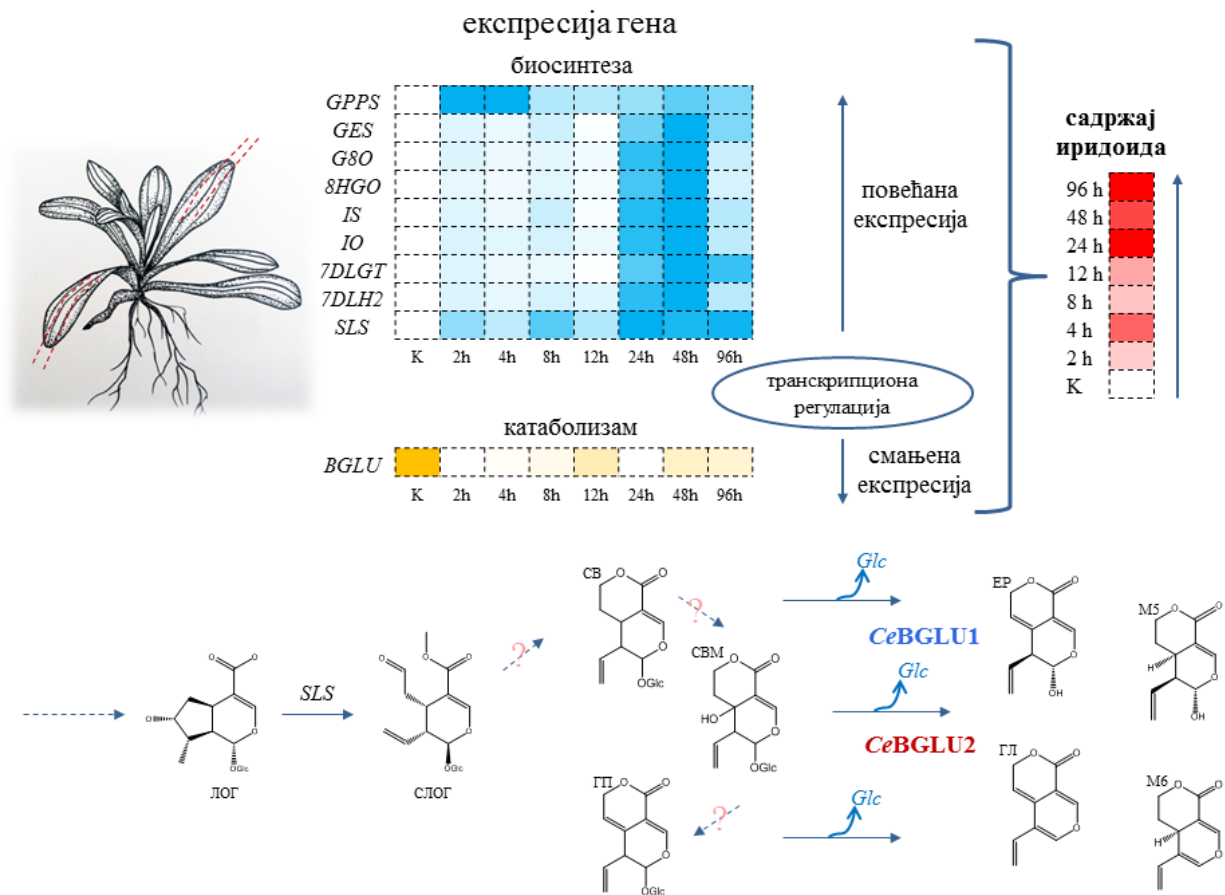
Биљке на оштећење ткива реагују активацијом сигналних путева који регулишу експресију гена на транскрипционом нивоу како на месту повреде, тако и у дисталним биљним органима. Кључни регулаторни механизам синтезе специјализованих метаболита је контрола биосинтетичких гена на нивоу транскрипције (*Mortensen* и сар., 2019). Јасмонска киселина (*JA*) и њени деривати се могу понашати као сигнални молекули који учествују у одговору биљке на стрес изазван повредом (*Goossens* и сар., 2016; *Schweizer* и сар., 2018; *Wang* и сар., 2019; *Wasternack* и *Strnad*, 2019). Након повреде биљног ткива ниво ендогене *JA* се значајно и брзо повећава у повређеном ткиву, али и у неповређеним деловима биљке (*Koo* и сар., 2009; *Toyota* и сар., 2018; *Wang* и сар., 2019). Повећани ниво јасмоната детектује COI1-JAZ ко-рецепторни комплекс, при чему COI1 врши убиквитинизацију JAZ транскрипционих репресора. Деградација JAZ репресора ослобађа јасмонат-зависне транскрипционе факторе који регулишу експресију гена укључених у одбрамбени одговор биљке (*Sanchez-Serrano*, 2017). Експресија структурних и регулаторних гена укључених у биосинтетски пут *MIA* код врсте *C. roseus* регулисана је јасмонатима, при чему COI1, MYC2 и JAZ представљају главне елементе сигналног пута *JA* (*Patra*, 2018). Транскрипциони фактор CrMYC2 активира ORCA транскрипционе факторе (првенствено CrORCA2 и CrORCA3), који затим индукују експресију појединих гена укључених у биосинтезу *MIA* (*Schweizer* и сар., 2018). Поред MYC2, транскрипциони фактори BIS1 и BIS2 су такође укључени у регулацију иридоидног дела биосинтетског пута *MIA* код врсте *C. roseus* (*Van Moerkercke* и сар., 2015, 2016). Наиме, показано је да појачана експресија CrBIS1 или CrBIS2 доводи до повећања нивоа експресије гена укључених у биосинтезу иридоида и раних гена *MEP* пута биосинтезе терпена, као и до акумулације *MIA* (*Van Moerkercke* и сар., 2015, 2016; *Wasternack* и *Strnad*, 2019). Сматра се да су ова два транскрипциона фактора код врсте *C. roseus* укључена у регулацију експресије структурних гена које MYC2/ORCA3 сигнална каскада не регулише (*Van Moerkercke* и сар., 2016; *Liu* и сар., 2017). Занимљиво је да у транскриптому листова кичице нису пронађени гени кандидати за ORCA транскрипционе факторе што не изненађује узевши у обзир да кичица не продукује *MIA*. Репресори MYC2 транскрипционог фактора, JAM1, JAM2 и JAM3 су такође укључени у сигнални пут *JA* (*Sasaki-Sekimoto* и сар., 2013). Ови транскрипциони фактори блокирају везивање MYC2 за промоторе гена укључених у сигнални пут *JA* код врсте *A. thaliana* (*Nakata* и сар., 2013).

На основу описаних литературних података у оквиру ове дисертације издвојени су и анализирани транскрипциони фактори за које се може претпоставити да су укључени у регулацију експресије гена укључених у биосинтетски пут секоиридоида кичице након

повреде. Анализом транскриптома надземног дела кичице идентификоване су нуклеотидне секвенце шест транскрипционих фактора (*CeMYC2*, *CeBIS1*, *CeJAZ1*, *CeCOI1*, *CeJAM2* и *CeJAM3*) за које се претпоставља да су укључени у регулацију биосинтезе секоиридоида код кичице након повређивања листова. Са друге стране, нуклеотидне секвенце за *CeORCA2* и *CeORCA3*, као и за *CeBIS2* транскрипционе факторе нису пронађене у доступном транскриптому листова кичице. Пораст нивоа транскрипта гена који кодирају за транскрипциони фактор *CeJAZ1* уочава се већ након 2 h у повређеним листовима. Ови резултати су у складу са подацима *Van Moerkercke* и сарадника (2016) који су показали да у листовима *C. roseus* након повређивања расте експресија *JAZ1* гена. У повређеним, али и у неповређеним листовима кичице детектована је повећана експресија гена *CeBIS1* која прати промену експресије *CeSLS* гена како на временској скали након повређивања листова, тако и по интензитету. Резултати *Van Moerkercke* и сарадника (2016) су показали да појачана експресија *BIS1* гена индукује синтезу ЛК и СЛОГ у биосинтетском путу *MIA* код врсте *C. roseus*, при чему је сличан образац промене експресије показан и за ген *BIS2*. *Kidd* и сарадници (2019) су такође показали да је низак садржај иридоида у корелацији са сниженом експресијом гена *BIS1* и *BIS2*, као и гена укључених у биосинтезу СЛОГ код *C. roseus*. Висок степен корелације нивоа експресије биосинтетских гена и неких транскрипционих фактора током одговора биљака на стрес повређивањем листова указује на координисану регулацију биосинтезе секоиридоида на транскрипционом нивоу.

Познато је да повређивање ткива доводи до повећања експресије различитих *JAZ* гена код појединих биљних врста што указује да специфични *JAZ* протеини у различитим ткивима или развојним стадијумима биљке могу учествовати у одговору биљака на специфичне услове у животној средини (*Sanchez-Serrano*, 2017). Егзогена примена *MeJA* утиче на промене у биосинтези различитих специјализованих метаболита биљака (*Cao* и сар., 2016; *Goossens* и сар., 2016). *Ali* и сарадници (2015) су на примеру фармаколошки значајне биљке *Artemisia absinthium* показали да примена јасмоната доводи до елицитације продукције артемизина, сесквитерпенског једињења које се користи као лек против маларије. *Miettinen* и сарадници (2014) су показали да примена *MeJA* доводи до повећања експресије гена који су укључени у биосинтетске путеве специјализованих метаболита врсте *C. roseus*, што даље доводи до пораста концентрације *MIA* како у целој биљци, тако и у суспензији ћелија након излагања *MeJA*. Примена *MeJA* у концентрацији од 250 μM такође индукује експресију гена за транскрипционе факторе који имају регулаторну улогу у синтези индолних алкалоида код врсте *C. roseus* (*Goklany* и сар., 2013). У истраживањима *Cao* и сарадника (2016) показано је да примена 250 μM *MeJA* утиче на промену у експресији 5206 гена врсте *Gentiana macrophylla*, при чему долази до стимулације акумулације специјализованих метаболита. До сличних резултата дошли су и *Hua* и сарадници (2014) након фолијарне примене *MeJA* на биљке врсте *G. macrophylla*, при чему је експресија биосинтетских гена који кодирају за секоиридоиде у кореновима и листовима била значајно повишена у односу на нетретиране биљке. Са друге стране, *Boroduske* и сарадници (2016) су установили да третман *MeJA* снижава количину секоиридоидних гликозида у листовима *C. erythraea*. Разлог супротног деловања *MeJA* на продукцију секоиридоида код кичице може бити дужина трајања третмана, с обзиром на чињеницу да су мерења садржаја метаболита вршена 14 дана од почетка излагања биљака елицитору. У ранијим истраживањима додавање *MeJA* у подлогу за *in vitro* гајење *C. erythraea* током 5 и 10 дана индуковало је акумулацију ЛОГ, СВМ и ГП у листовима кичице, али није забележено статистички значајно повећање садржаја СВ и СЛОГ (*Matekalo* и сар., 2018). Истовремено, повећање експресије појединих гена укључених у биосинтезу секоиридоида (*Ce8HGO*, *Ce7DLH2*, *CeIO*, *CeSLS*, *CeG8O*, *Ce7DLGT*) детектовано је 5 дана након примене *MeJA* (*Matekalo* и сар., 2018). У оквиру ове дисертације праћене су промене у садржају иридоида изазване повређивањем ткива листова и примећено је да

долази до значајног повећања садржаја свих иридоида са изузетком ЛОГ. Такође, детектован је повишен ниво експресије свих биосинтетских гена (са изузетком *CeGPPS*) и то 24 h, тј. 48 h након повреде са тенденцијом опадања нивоа експресије 96 h после повређивања.



Слика 40. Схематски приказ ефекта механичког повређивања листова кичице на метаболизам секоиридоида. Оштећење листова индукује појачану експресију биосинтетских гена (*GPPS*, *GES*, *G8O*, *8HGO*, *IS*, *IO*, *7DLGT*, *7DLH2*, *SLS*) и истовремено доводи до снижене експресије гена за β -глюкозидазу (*BGLU*), која катализује прву реакцију у катаболизму секоиридоидних глюкозида. Резултат је интензивнија продукција и акумулација секоиридоида у листовима кичице. Ген за секологанин синтазу препознат је као кључни у регулацији флукса кроз метаболички пут. Идентификоване су две варијанте ензима β -глюкозидаза које показују високу специфичност ка секоиридоидним глюкозидима као супстратима, *CeBGLU1* и *CeBGLU2*. Скраћенице: *GPPS* геранил дифосфат синтаза, *GES* гераниол синтаза, *G8O* гераниол 8-оксидаза, *8HGO* 8-хидроксигераниол оксидоредуктаза, *IS* иридоид синтаза, *IO* иридоид оксидаза, *7DLGT* глюкозил трансфераза 7-деоксилоганетинске киселине, *7DLH2* хидроксилаза 7-деоксилоганетинске киселине, *SLS* секологанин синтаза, *BGLU* β -глюкозидаза, ЛОГ логанин, СЛОГ секологанин, СВ сверозид, СВМ сверцијамарин, ГП генциопикрин, ЕР еритроцентаурин, ГЛ генциопикрал.

У циљу добијања додатних информација о улози сигналног пута *JA* у регулацији биосинтезе секоиридоида анализиран је ефекат третмана *MeJA* у краћим временским интервалима у односу на претходно поменута истраживања. Добијени резултати су показали да се повећање садржаја секоиридоида може детектовати 48 h након примене *MeJA*. Међусобно сличан образац промене експресије показали су гени *CeSLS* и *CeBIS1* чија се

експресија значајно повећава 48 h након третмана *MeJA*. Са друге стране, повећање експресије гена *CeJAZ1* забележено је 1 h и 48 h након третмана *MeJA*. Претходна истраживања *Kato* и сарадника (2013) и *Toda* и сарадника (2013) показују да додавање *JA* у подлогу индукује повећање експресије *JAZ* гена, а истовремено утиче и на повећање експресије *SLS* код врсте *Oryza sativa*. Повреда индукује акумулацију *JA* и њених деривата у листовима *A. thaliana* што је праћено и повећањем експресије *JAZ7* гена (*Toyota* и сар., 2018). Код врсте *C. roseus* повећање нивоа *JA* иницирало је повећање експресије *BIS2* гена, што је даље довело до појачане акумулације метилеритрол-4-фосфата и индукције експресије гена биосинтетског пута иридоида (*Van Moerkercke* и сар., 2016).

На основу резултата добијених у оквиру ове дисертације може се закључити да експресија већине гена укључених у биосинтезу секоиридоида расте након повређивања листова, а да је највећа промена у експресији забележена за ген секологанин синтазу (*CeSLS*) који катализује реакцију превођења ЛОГ у СЛОГ. Највећи пораст у нивоу експресије гена из биосинтетског пута секоиридоида и гена који кодирају за транскрипционе факторе забележен је 24 h и 48 h након повреде, што је даље довело до значајног повећања у акумулацији секоиридоида. Међу анализираним транскрипционим факторима повећана експресија *CeBIS1* гена у складу је са експресијом биосинтетског гена *CeSLS*, што указује да овај транскрипциони фактор има значајну регулаторну улогу у синтези секоиридоида након повреде листова кичице. Осим тога, *CeSLS* је препознат као важан ген (ензим) који регулише синтезу секоиридоида и одређује метаболички флуks кроз секоиридоидни биосинтетски пут, а претпоставља се да је под контролом *CeBIS1* транскрипционог фактора. Представљени резултати такође показују да сигнални пут *JA* има улогу у регулацији биосинтезе секоиридоида кичице након механичке повреде.

Акумулација стриктозидина и истовремено повећање експресије стриктозидин- β -глукозидазе код врсте *C. roseus* након повреде један је од примера двокомпонентног одбрамбеног одговора биљке на повреду изазвану нападом хербивора (*De Bernonville* и сар., 2016). У оквиру ове дисертације издвојени су гени кандидати за β -глукозидазу поређењем транскриптома надземног дела кичице са секвенцом окарактерисане стриктозидин- β -глукозидазе код врсте *C. roseus*. Прегледом литературе није установљено присуство стриктозидина и других алкалоида код кичице. Међутим, стриктозидин у биосинтетском путу *MIA* код *C. roseus* настаје директно од СЛОГ, па је претпоставка била да су β -глукозидазе кичице које показују високу специфичност ка секоиридоидима као супстрату ензими слични поменутом ензиму врсте *C. roseus*. Треба нагласити да је услед високе хомологије секвенци два гена кандидата било могуће дизајнирати само један пар прајмера за квантитативни *PCR* који амплификује секвенце *CeBGLU1* и *CeBGLU2*. Добијени резултати су указали да је ниво експресије гена за β -глукозидазу у листовима кичице значајно виши у односу на корен, што не чуди ако се узме у обзир чињеница да су управо листови главно место биосинтезе и акумулације секоиридоида код кичице (*Šiler* и сар., 2014; *Matekalo* и сар., 2018), те да и гени укључени у биосинтезу секоиридоида такође показују виши ниво експресије у листовима у односу на корен (*Matekalo* и сар., 2018). За разлику од биосинтетских гена секоиридоидног пута, експресија гена за ензим β -глукозидазу у повређеним листовима кичице значајно опада након повређивања. Претходна истраживања *Ogasawara* и сарадника (2009) показују да се гени за различите β -глукозидазе код врсте *A. thaliana* експримирају на различит начин након механичке повреде. Експресија гена *AtBGLU18* расте у повређеним котиледонима 66 h након механичке повреде, док гени *AtBGLU20*, *AtBGLU21* и *AtBGLU22* показују смањен ниво експресије у локалним и целим листовима клијанца у поређењу са интактним котиледонима. Смањење нивоа експресије *AtBGLU11* и *AtBGLU46* гена уочено је 24 h након излагања стресу. Физиолошка суша изазвана додавањем полиетиленгликола у подлогу такође доводи до опадања нивоа

експресије појединих гена који кодирају за ензим β -глукозидазу код врсте *A. thaliana* (Cao и сар., 2017). Експресија гена за β -глукозидазу *Os1BGlu4* опада након повреде листова *Oryza sativa* (Rouyi и сар., 2014), док ген за β -глукозидазу код врсте *Lamium galeobdolon*, *LgGLU2*, након повреде не показује промене у експресији, иако је показано да ефикасно хидролизује супстрат олеуропеин (Hannemann и сар., 2018).

Сви наведени резултати указују на битну улогу β -глукозидаза у одбрамбеном одговору кичице на стрес изазван повређивањем и наводе на претпоставку да су ови хидролитички ензими такође укључени у одговор биљке на друге врсте стимулуса из спољашње средине (напад патогена, хербивора, и сл.).

5.5. Карактеризација ензима β -глукозидазе код врсте *C. erythraea*

Један од битних корака у савременим истраживањима која се баве продукцијом специјализованих метаболита из обновљивих извора представља изолација и функционална карактеризација гена укључених у њихов метаболизам, као и примена генетичког инжењеринга. Познавање одређеног биосинтетског пута, као и механизма његове регулације под утицајем различитих ендогених и егзогених фактора, представља битан предуслов за подстицање продукције биоактивног једињења од интереса и усмеравање метаболичког флукса у жељеном правцу. Подједнако је важно расветлити/дефинисати све факторе који учествују у катаболизму ових једињења пошто садржај биоактивних једињења у биљци у различитим ткивима и органима током онтогеније и у променљивим условима спољашње средине зависи од баланса између њихове производње и разградње. Због тога је један од циљева ове докторске дисертације био идентификација гена и ензима који су укључени у катаболизам секоиридоидних глукозида код кичице, а први корак у овом процесу катализује ензим β -глукозидаза.

Коришћењем података о транскриптому листова кичице конструисани су прајмери који су омогућили изолацију пуне дужине гена који кодира за β -глукозидазу, а за који је претпостављено да може имати високу специфичност ка секоиридоидним глукозидима као супстрату. Ген је клониран у *pTZ57R/T* вектор након чега је секвенцирањем проверена исправност клонирања. На основу добијених података установљено је да постоје два гена кандидата за β -глукозидазу која се разликују у 12 нуклеотида, а који су означени као *CeBGLU1* и *CeBGLU2*. На аминокиселинском нивоу говоримо о разлици између две форме ензима од свега 4 аминокиселине.

Упоређивањем секвенци већег броја β -глукозидаза окарактерисаних из различитих биљних врста и конструисањем филогенетског стабла уочено је да се *CeBGLU1* и *CeBGLU2* групишу по сличности са β -глукозидазама укљученим у метаболизам монотерпеноидних једињења код појединих припадника породице Аросупасеае, односно код врста *R. serpentina* и *C. roseus*. Од универзалног прекурсора СЛОГ синтетишу се секоиридоиди и *MIA* код многих биљних врста. Код врста *C. roseus* и *R. serpentina* се у путу низводно од СЛОГ синтетише стриктозидин-прекурсор многих *MIA*, док се код врсте *C. erythraea* ова грана наставља ка биосинтези секоиридоидних глукозида СВ, СВМ и ГП и других мање заступљених једињења ове групе. Глукозиди који настају у метаболичком путу *MIA* код врста *C. roseus* и *R. serpentina* а налазе се низводно од СЛОГ, као што су стриктозидин и раукафрицин, подлежу деловању ензима β -глукозидазе (Barleben и сар., 2007; Xia и сар., 2012). На основу аминокиселинске секвенце протеина *CeBGLU1* и *CeBGLU2*, филогенетске анализе, као и поређења секвенци са β -глукозидазама других биљних врста, идентификован је мотив

одговоран за каталитичку активност фамилије глукозидних хидролаза 1 (*Warzecha* и сар., 2000). Ова аминокиселинска секвенца: изолеуцин/валин (*Ile/Val*) - треонин (*Thr*) - глутаминска киселина (*Glu*) - аспарагин (*Asn*) - глицин (*Gly*) се налази на позицијама од 418 до 422 аминокиселинског ланца. *Glu* на позицији 207 ензима стриктозидин- β -глукозидазе код врсте *R. serpentina* је донор протона који омогућава нуклеофилни напад *Glu* (на позицији 416) на C1 угљеников атом супстрата (*Barleben* и сар., 2007). Обе аминокиселине су одговорне за хидролизу глукозидне везе супстрата, а у случају замене ових аминокиселина ензим стриктозидин- β -глукозидаза губи хидролитичку активност. Ензими *CeBGLU1* и *CeBGLU2* поседују *Glu* на позицијама 186 и 420. Хистидин (*His*) на позицији 161 стриктозидин- β -глукозидазе везује глукозидни део молекула супстрата и стабилизује прелазно стање током хидролизе (*Barrett* и сар., 1995). *His* се код изолованих протеина *CeBGLU1* и *CeBGLU2* налази на позицији 141. Рекомбинантни протеини (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*) показују највећи степен хомологије са раукафрицин-*O*- β -*D*-глукозидазом врсте *R. serpentina* (сличност аминокиселинске секвенце је већа од 65%). Триптофан (*Trp*) на позицији 392 раукафрицин-*O*- β -*D*-глукозидазе одређује облик везивног места за супстрат раукафрицин, док серин (*Ser*) на позицији 390 обезбеђује конформацију *Trp* која омогућава да овај ензим катализује и реакцију хидролизе стриктозидина (*Xia* и сар., 2012). Са друге стране, стриктозидин- β -глукозидаза исте биљне врсте не може да хидролизује глукозидну везу молекула раукафрицина уколико је *Ser* на позицији 386 замењен *Gly*. У том случају *Trp* интерагује са фенилаланином (*Phe*) на позицији 485, при чему настаје место за које може да се веже стриктозидин, али не и раукафрицин. Пречишћени ензими *CeBGLU1* и *CeBGLU2*, као и раукафрицин-*O*- β -*D*-глукозидаза, поседују *Ser* на позицији 390.

Утврђивање сличности на нивоу аминокиселинских секвенци пречишћених ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2* са осталим биљним β -глукозидазама представља почетни корак у додели релевантне функције ензиму. Наредни корак подразумева производњу довољне количине ензима да би се његова функција испитала, што је постигнуто методом хетерологе експресије гена кандидата за β -глукозидазу кичице у организму домаћину (бактерија *E.coli*). Након изолације ензима синтетисаног у организму домаћину протеин је коришћен у реакцијама са потенцијалним супстратима, односно глукозидима који поседују β -*D*-глукозидне везе. Традиционални приступ додељивања функције одређеном ензиму се заснива на реакцији ензима са специфичним супстратом (*Ketudat Cairns* и сар., 2015) која се изводи у условима *in vitro*. Ензими β -глукозидазе се сматрају „промискуитетним“ ензимима имајући у виду чињеницу да катализују реакцију хидролизе β -*D*-глукозидне везе једињења из различитих класа специјализованих метаболита. Ова чињеница отежава одређивање специфичности за супстрат и доделу релевантне биолошке функције овим ензимима. Синтетички супстрати који су комерцијално доступни, као што су 4-нитрофенил- β -*D*-галактопиранозид, 4-нитрофенил- β -*D*-тиоглукозид и 4-нитрофенил- β -*D*-глукопиранозид (*pNPG*), су најчешће коришћени супстрати за потврду функције β -глукозидазе (*Czjzek* и сар., 2000; *Geerlings* и сар., 2000; *Warzecha* и сар., 2000; *Morant* и сар., 2008; *Shaik* и сар., 2013; *Tiwari* и *Verma*, 2016). Хетерологи ензими бројних биљних врста су показали хидролитичку активност у реакцији са *pNPG*. Ензими изоловани из врсте *Lamium galeobdolon* (*LgGLU2* и *LgGLU4*) хидролизују *pNPG*, али се ефикасност два ензима у тој реакцији разликује (*Hannemann* и сар., 2018). Пречишћене β -глукозидазе врсте *Lotus japonicus* (*LjBGD2* и *LjBGD4*) такође хидролизују *pNPG*, али показују већи афинитет према супстратима које синтетише сама биљка, као што су пруназин, лотаустралин и родиоцијанозид (*Morant* и сар., 2008). Познато је, такође, да β -глукозидазе неких биљних врста нису увек ефикасне у реакцији са комерцијалним супстратом. Тако β -глукозидаза *OeGLU* врсте *Olea europaea* не показује хидролитичку активност према тестираном супстрату *pNPG*, па јој је функција додељена на основу реакције у којој ефикасно хидролизује специфични супстрат

секоиридоид олеуропеин (*Koudounas* и сар., 2015). Такође, β -глукозидазе врсте *A.thaliana* (*AtBGLU21*, *AtBGLU22* и *AtBGLU23*) хидролизују тропански алкалоид скополин, али не испољавају хидролитичку активност према комерцијалном супстрату (*Ahn* и сар., 2010). Током реакције *CeBGLU1* и *CeBGLU2* са супстратом *pNPG* долази до ослобађања хромофоре 4-нитрофенола што указује на хидролитичку активност пречишћених протеина у реакцији са комерцијалним супстратом. Слично као у случају β -глукозидаза врсте *Lamium galeobdolon* (*LgGLU2* и *LgGLU4*) ефикасност хидролизе *pNPG* се разликује између два ензима, па *CeBGLU2* испољава већи афинитет према комерцијалном супстрату *pNPG* у поређењу са *CeBGLU1*.

За даље утврђивање функције β -глукозидаза изолованих из кичице (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*) коришћен је читав низ потенцијалних супстрата из група иридоида и фенола, а њихова квантификација је урађена методом течне хроматографије са *UV* и масеном детекцијом (*UHPLC/DAD/(-)HESI-MS/MS*). Због нестабилности продуката који настају након хидролизе секоиридоидних глукозида када се са молекула одстрани глукоза, хидролитичка активност ензима утврђена је на основу опадања количине супстрата у реакционој смеши. Испитана је такође хидролитичка способност изолованих ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2* на екстрактима кичице у којима је праћен садржај најзаступљенијих секоиридоидних глукозида СВ, СВМ и ГП пре и након ензиматске хидролизе. У реакцији са екстрактима кичице *CeBGLU1* и *CeBGLU2* хидролизују СВ, СВМ и ГП, при чему је *CeBGLU2* у овој реакцији ефикаснији од *CeBGLU1*. Интересантно, међу анализираним дериватима СЛОГ најслабији афинитет у екстрактима кичице ови ензими (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*) испољавају према СВМ, који поседује бочну *ОН* групу везану на позицији *C5*, а коју СВ и ГП не поседују. Исти афинитет према ова три супстрата показује и комерцијална β -глукозидаза из бадема.

Сличан резултат је добијен и у реакцији ензима са стандардом СВМ. У реакцији са *CeBGLU1* не долази до значајне хидролизе овог једињења, док *CeBGLU2* врши хидролизу више од половине СВМ доступног у реакционој смеши. Синтетисани ензими *CeBGLU1* и *CeBGLU2* са високом ефикасношћу хидролизују стандард ГП. Хидролиза СВ посредством *CeBGLU1* није значајна у конкретним условима ензимске реакције. Међутим, *CeBGLU2* показује високу ефикасност у хидролизи сверозида.

Ензим *CeBGLU1* испољава хидролитички потенцијал према иридоидним глукозидима који се јављају узводно од СЛОГ у биосинтетском путу, посебно према ЛОГ, за разлику од *CeBGLU2* који не хидролизује стандарде ДК и ЛОГ. Ни један од анализираних ензима није показао значајан афинитет ка СЛОГ и ДК као супстратима. Поред стандарда иридоидног порекла функција изолованих протеина испитана је и на доступним глукозидима фенолних једињења који се одликују присуством β -глукозидне везе. Глукозиди фенолних једињења такође подлежу ензиматској хидролизи у реакцији у којој се ослобађају реактивни агликони (*Lin* и сар., 2006). У експерименту ензиматске хидролизе метанолних екстраката кичице помоћу комерцијалне β -глукозидазе из бадема показано је да овај ензим хидролизује и нека фенолна једињења која су присутна у екстракту (глукозиди кверцетина и лутеолина). Због тога је испитан афинитет *CeBGLU1* и *CeBGLU2* за доступне стандарде фенолних глукозида изокверцетрина (кверцетин 3-*O*-глукозид), апигетрина (апигенин 7-*O*-глукозид) и витексина (апигенин 8-*C*-глукозид). Хидролитичка активност у реакцији са ИК, АП и ВТ зависи од врсте ензима (*CeBGLU1* или *CeBGLU2*), као и од супстрата. Готово тотална хидролиза АП забележена је у реакцији са *CeBGLU1*, док је у реакцији са *CeBGLU2* хидролиза у извесној мери слабија. Статистички значајно смањење ИК у реакцији са оба ензима није забележено, иако се може уочити тренд смањења. Ниједан од изолованих ензима није катализовао реакцију хидролизе ВТ. Из свега наведеног може се рећи да *CeBGLU2* показује високу специфичност ка секоиридоидним глукозидима као супстрату, а нарочито ка

ГП и СВ. Друга варијанта ензима, *CeBGLU1*, показује афинитет ка супстратима нешто ширег опсега, што укључује иридоид ЛОГ и глукозид апигенина (апигетрин). Овакви резултати нису изненађујући ако се узме у обзир чињеница да су β -глукозидазе „промискуитетни“ ензими који могу да хидролизују већи број супстрата. Специфична функција *CeBGLU1* и *CeBGLU2* одређена је на основу њиховог високог афинитета ка секоиридоидним глукозидима као супстратима. Треба имати у виду да предмет докторске дисертације није било испитивање кинетике ових ензима, па тако не треба искључити могућност да би у неким другим условима резултати ензимских реакција одступали од приказаних.

Потврдом функције ензима изолованих из кичице (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*) створени су услови за детаљна истраживања функције ових ензима током одговора биљака на стрес изазван различитим абиотичким и биотичким факторима. Нарочито је занимљиво открити на који начин ови ензими учествују у модификацији метаболизма секоиридоидних глукозида услед напада патогена и хербивора који, осим што такође изазивају повреде ткива, учествују у хидролизи глукозилованих једињења сопственим β -глукозидазама.

Значај резултата ове докторске дисертације огледа се и у томе што су створени услови за метаболички инжењеринг и манипулације метаболичког пута секоиридоидних глукозида у циљу оптимизације производње ових битних биоактивних једињења. Једна од могућности јесте стишавање гена који кодирају за *CeBGLU1* и *CeBGLU2* у биљкама, чиме би био редукован катаболизам секоиридоидних глукозида и омогућена њихова појачана акумулација у биљкама. Појачаном експресијом неких од транскрипционих фактора који су у оквиру ове дисертације издвојени као битни у регулацији метаболизма секоиридоида може се постићи координисана индукција активности биосинтетских гена и самим тим појачати метаболички флуks. Комбинацијом различитих техника метаболичког инжењеринга и биотехнологије у будућности може бити постигнута одржива продукција секоиридоидних глукозида из обновљивих извора.

6. ЗАКЉУЧЦИ

- Главни продукти специјализованог метаболизма кичице, секоиридоидни глукозиди, подлежу ензиматској хидролизи помоћу β -глукозидазе, при чему се ослобађају нестабилни агликони који се даље укључују у метаболичке процесе биљака.
- Гљива *Penicillium funiculosum* ефикасно метаболише сублеталне концентрације секоиридоидних глукозида кичице (сверозид, сверцијамарин и генциопикрин) помоћу сопствених β -глукозидаза.
- Ензиматска хидролиза екстракта кичице и секоиридоидних глукозида помоћу β -глукозидазе делимично побољшава њихов антиоксидативни потенцијал, али не утиче значајно на антимикуробно дејство.
- Механичко повређивање листова кичице доводи до интензивније акумулације секоиридоида након 96 h што је резултат како повећане експресије већине биосинтетских гена (*CeGPPS*, *CeGES*, *CeG8O*, *Ce8HGO*, *CeIS2*, *CeIO*, *Ce7DLGT*, *Ce7DLH2* и *CeSLS*) након 24 h, тако и снижене експресије гена за ензим β -глукозидазу која катализује први корак њихове разградње.
- Секологанин синтаза кичице (*CeSLS*) која катализује реакцију превођења логанина до секологанина, највероватније представља ензим са кључном улогом у регулацији протока метаболита кроз биосинтетски пут секоиридоидних глукозида.
- Биосинтетски гени укључени у метаболизам секоиридоида су координисано експримирани током одговора листова на стрес механичким повређивањем и значајно корелисани са експресијом гена за транскрипциони фактор *BIS1* (*CeBIS1*), што указује на регулацију биосинтетског пута секоиридоида на нивоу транскрипције под утицајем сигналног пута јасмонске киселине.
- Из кичице су изоловане две изоформе ензима β -глукозидазе (*CeBGLU1* и *CeBGLU2*) које показују високу специфичност за секоиридоидне глукозиде као супстрат чиме је по први пут потврђена функција биљних β -глукозидаза карактеристичних за ову групу једињења.
- Хидролитичка функција ензима потврђена је њиховом хетерологом експресијом у организму домаћину (*Escherichia coli*), пречишћавањем рекомбинантних протеина и ензиматским тестовима изведеним у условима *in vitro*. Ова стратегија се показала као веома ефикасна приликом доделе функције генима који кодирају за β -глукозидазе кичице, а може послужити и у карактеризацији других гена биосинтетског пута секоиридоида.
- Биосинтеза и акумулација секоиридоидних глукозида може бити подстакнута у експерименталним условима повређивањем ткива и применом елицитора метил јасмоната, што може бити примењено у пракси у циљу веће ефикасности производње ових значајних биоактивних једињења.
- Метаболички инжењеринг који би укључио стишавање гена за β -глукозидазе или појачану експресију транскрипционих фактора и биосинтетских гена може у будућности обезбедити одрживу производњу секоиридоидних глукозида и њихових деривата из обновљивих извора.

7. ЛИТЕРАТУРА

- Aberham, A., Pieri, V., Croom, E.M., Ellmerer, E., Stuppner, H., 2011. Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54, 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.030>
- Afendi, F.M., Okada, T., Yamazaki, M., Hirai-Morita, A., Nakamura, Y., Nakamura, K., Ikeda, S., Takahashi, H., Altaf-Ul-Amin, M., Darusman, L.K., Saito, K., Kanaya, S., 2012. KNApSACk family databases: Integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol.* 53, 1–12. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr165>
- Ahamad, J., Hassan, N., Amin, S., Mir, S.R., 2016. Swertiamarin contributes to glucose homeostasis via inhibition of carbohydrate metabolizing enzymes. *J. Nat. Remedies* 16, 125–130. <https://doi.org/10.18311/jnr/2016/7634>
- Ahn, Y.O., Shimizu, B.I., Sakata, K., Gantulga, D., Zhou, Z., Bevan, D.R., Esen, A., 2010. Scopolin-hydrolyzing β -glucosidases in roots of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 51, 132–143. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp174>
- Alamgir, A.N.M., 2017. Progress in Drug Research, Volume 73: Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1: Pharmacognosy. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-63862-1>
- Ali, M., Abbasi, B.H., Ali, G.S., 2015. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 120, 1099–1106. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0666-2>
- Allina, S.M., Pri-Hadash, A., Theilmann, D.A., Ellis, B.E., Douglas, C.J., 1998. 4-Coumarate:Coenzyme A Ligase in Hybrid Poplar. Properties of Native Enzymes, cDNA Cloning, and Analysis of Recombinant Enzymes. *Plant Physiol.* 116, 743–754. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.743>
- Alves, M.N., Sartoratto, A., Trigo, J.R., 2007. Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): Defense, allocation, costs, and induced response. *J. Chem. Ecol.* 33, 297–309. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9214-9>
- Asada, K., Salim, V., Masada-Atsumi, S., Edmunds, E., Nagatoshi, M., Terasaka, K., Mizukami, H., De Luca, V., 2013. A 7-Deoxyloganetic acid glucosyltransferase contributes a key step in secologanin biosynthesis in madagascar periwinkle. *Plant Cell* 25, 4123–4134. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115154>
- Atkinson, N.J., Lilley, C.J., Urwin, P.E., 2013. Identification of genes involved in the response of arabidopsis to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* 162, 2028–2041. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222372>
- Banjanac, T., Dragicevic, M., Siler, B., Gasic, U., Bohanec, B., Nestorovic Zivkovic, J., Trifunovic, S., Mistic, D., 2017. Chemodiversity of two closely related tetraploid *Centaurium* species and their hexaploid hybrid: Metabolomic search for high-resolution taxonomic classifiers.

Phytochemistry 140, 27–44. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.005>

- Barbehenn, R. V., Peter Constabel, C., 2011. Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 72, 1551–1565. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040>
- Barleben, L., Panjikar, S., Ruppert, M., Koepke, J., Stöckigta, J., 2007. Molecular architecture of strictosidine glucosidase: The gateway to the biosynthesis of the monoterpenoid indole alkaloid family. *Plant Cell* 19, 2886–2897. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045682>
- Barrett, T., Suresh, C.G., Tolley, S.P., Dodson, E.J., Hughes, M.A., 1995. The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* 3, 951–960. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00229-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00229-5)
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K., Arora, S., 2013. Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. *J. Plant Growth Regul.* 32, 216–232. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9272-x>
- Bennett, R.N., Wallsgrave, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 127, 617–633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ““ Antioxidant Power ””: The FRAP Assay 76, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berkan, T., Ustunes, L., Lermioglu, F., Ozer, a, 1991. Antiinflammatory, analgesic, and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centaurium*. *Planta Med.* 57, 34–37. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960011>
- Boroduske, A., Nakurte, I., Tomsone, S., Lazdane, M., Boroduskis, M., Rostoks, N., 2016. In vitro culture type and elicitation affects secoiridoid and xanthone LC–ESI–TOF MS profile and production in *Centaureum erythraea*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 126, 567–571. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1016-3>
- Bouvier, F., D’Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R.A., Camara, B., 1998. Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol.* 117, 1423–1431. <https://doi.org/10.1104/pp.117.4.1423>
- Bowers, M.D., Puttick, M.G., 1988. Response of generalist and specialist insects to qualitative allelochemical variation. *J. Chem. Ecol.* 14, 319–334.
- Box, G.E.P., Cox, D.R., 1964. An analysis of transformations. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 26, 211–243.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bricchi, I., Leitner, M., Foti, M., Mithöfer, A., Boland, W., Maffei, M.E., 2010. Robotic mechanical wounding (MecWorm) versus herbivore-induced responses: Early signaling and volatile emission in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Planta* 232, 719–729. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1203-0>
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., Palme, K., 1993. Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* (80-.). 262, 1051–1054. <https://doi.org/10.1126/science.8235622>

- Cao, T.W., Geng, C.A., Ma, Y.B., He, K., Wang, H.L., Zhou, N.J., Zhang, X.M., Tao, Y.D., Chen, J.J., 2013. Xanthonenes with anti-hepatitis B virus activity from *Swertia mussotii*. *Planta Med.* 79, 697–700. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328399>
- Cao, X., Guo, X., Yang, X., Wang, H., Hua, W., He, Y., Kang, J., Wang, Z., 2016. Transcriptional responses and gentiopicroside biosynthesis in methyl jasmonate-treated *Gentiana macrophylla* seedlings. *PLoS One* 11, e0166493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166493>
- Cao, X.Y., Wang, Z.J., Wang, Z.Z., 2012. Comparative analysis of contents of four iridoid glucosides in different organs of four species of *Gentiana* L. *J Plant Resour Env.* 21, 58–63.
- Cao, Y.Y., Yang, J.F., Liu, T.Y., Su, Z.F., Zhu, F.Y., Chen, M.X., Fan, T., Ye, N.H., Feng, Z., Wang, L.J., Hao, G.F., Zhang, J., Liu, Y.G., 2017. A phylogenetically informed comparison of GH1 hydrolases between arabidopsis and rice response to stressors. *Front. Plant Sci.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00350>
- Chandra, H., Bishnoi, P., Yadav, A., Patni, B., Mishra, A.P., Nautiyal, A.R., 2017. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials - A review. *Plants* 6, 457–462. <https://doi.org/10.3390/plants6020016>
- Chang, I.M., 1997. Antiviral activity of aucubin against hepatitis B virus replication. *Phyther. Res.* 11, 189–192. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199705\)11:3<189::AID-PTR67>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199705)11:3<189::AID-PTR67>3.0.CO;2-R)
- Chaves, J.Q., Pires, E.S., Vivoni, A.M., 2011. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.029>
- Cheng, A.X., Lou, Y.G., Mao, Y.B., Lu, S., Wang, L.J., Chen, X.Y., 2007. Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *J. Integr. Plant Biol.* 49, 179–186. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00395.x>
- Cheong, Y.H., 2002. Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 129, 661–677. <https://doi.org/10.1104/pp.002857>
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., Martens, S., 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem.* 72, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., Solano, R., 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., Solano, R., 2016. Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.005>
- Chung, K.-T., Lu, Z., Chou, M.W., 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem. Toxicol.* 36, 1053–1060.
- Cisneros-Zevallos, L., 2003. The Use of Controlled Postharvest Abiotic Stresses as a Tool for Enhancing the Nutraceutical Content and Adding-Value. *J. Food Sci.* 68.

- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In: Approved Standard, 8th Ed. CLSI Publication M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Colinas, M., Goossens, A., 2018. Combinatorial Transcriptional Control of Plant Specialized Metabolism. *Trends Plant Sci.* 23, 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.12.006>
- Collu, G., Unver, N., Peltenburg-Looman, A.M.G., Van der Heijden, R., Verpoorte, R., Memelink, J., 2001. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett.* 508, 215–220. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03045-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03045-9)
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564–582. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., others, 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochem. Mol. Biol. plants* 24, 1250–1319.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D.R., Henrissat, B., Esen, A., 2000. The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13555–13560. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.25.13555>
- Darrow, K., Bowers, M.D., 1999. Effects of herbivore damage and nutrient level on induction of iridoid glycosides in *Plantago lanceolata*. *J. Chem. Ecol.* 25, 1427–1440. <https://doi.org/10.1023/A:1020991229072>
- De Bernonville, T.D., Carquejeiro, I., Lanoue, A., Lafontaine, F., Sánchez Bel, P., Liesecke, F., Musset, K., Oudin, A., Glévarec, G., Pichon, O., Besseau, S., Clastre, M., St-Pierre, B., Flors, V., Maury, S., Huguet, E., O'Connor, S.E., Courdavault, V., 2017. Folivory elicits a strong defense reaction in *Catharanthus roseus*: Metabolomic and transcriptomic analyses reveal distinct local and systemic responses. *Sci. Rep.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep40453>
- De Castro, A.M., De Albuquerque De Carvalho, M.L., Leite, S.G.F., Pereira, N., 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: Production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 151–158. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0656-2>
- Dekker, R.F.H., 1986. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial β -D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1438–1442.
- Delessert, C., Wilson, I., Van Der Straeten, D., Dennis, E., Dolferus, R., 2004. Spatial and temporal analysis of the local response to wounding. *Plant Mol. Biol.* 55, 165–181. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0112-7>
- Dhalla, N.S., Temsah, R.M., Neticadan, T., 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* 18, 655–673.
- Dharmawardhana, D.P., Ellis, B.E., Carlson, J.E., 1995. A beta-glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol.* 107, 331–339. <https://doi.org/10.1104/pp.107.2.331>
- Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., Mauriello, G., 2010. Changes in the proteome of *Salmonella enterica sero var Thompson* as stress adaptation to sublethal concentrations of

thymol. Proteomics 10, 1040–1049. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900568>

- Dietz, K., Sauter, A., Wichert, K., Messdaghi, D., Hartung, W., 2000. Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *J. Exp. Bot.* 51, 937–944. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.346.937>
- Dilika, F., Bremner, P.D., Meyer, J.J.M., 2000. Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: A plant used during circumcision rites. *Fitoterapia* 71, 450–452. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00150-7)
- Dogan, S., Diken, M.E., Dogan, M., 2010. Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants. *J. Med. Plants Res.* 4, 2566–2572. <https://doi.org/10.5897/jmpr10.626>
- Đorđević, M., Mihailović, M., Arambašić Jovanović, J., Grdović, N., Uskoković, A., Tolić, A., Sinadinović, M., Rajić, J., Mišić, D., Šiler, B., Poznanović, G., Vidaković, M., Dinić, S., 2017. *Centaurium erythraea* methanol extract protects red blood cells from oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 202, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.016>
- Dudareva, N., Pichersky, E., 2000. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol.* 122, 627–633. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.627>
- Dutta, A., Sen, J., Deswal, R., 2007. Downregulation of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway by low temperature and cloning of a AP2 type C-repeat binding factor (CBF) from *Catharanthus roseus* (L). G. Don. *Plant Cell Rep.* 26, 1869–1878. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0383-y>
- El-Sedawy, A.I., Hattori, M., Kobashi, K., Namba, T., 1990. Metabolism of sweroside from *Swertia japonica* by human intestinal bacteria. *Shoyakugaku Zasshi* 44, 122–126.
- El-Sedawy, A.I., Hattori, M., Kobashi, K., Namba, T., 1989a. Metabolism of Gentiopicroside (Gentiopicrin) by Human Intestinal Bacteria. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 37, 2435–2437. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.2435>
- El-Sedawy, A.I., Shu, Y.-Z., Hattori, M., Kobashi, K., Namba, T., 1989b. Metabolism of Swertiamarin from *Swertia japonica* by Human Intestinal Bacteria. *Planta Med* 55, 147–150. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961909>
- El-Seedi, H., El-Ghorab, D., El-Barbary, M., Zayed, M., Goransson, U., Larsson, S., Verpoorte, R., 2009. Naturally Occurring Xanthenes; Latest Investigations: Isolation, Structure Elucidation and Chemosystematic Significance. *Curr. Med. Chem.* 16, 2581–2626. <https://doi.org/10.2174/092986709788682056>
- Espinel-Ingroff, A., 2001. *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 39, 954–958. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.954-958.2001>
- European Pharmacopoeia, 2017. 9th Edition. Vol. 9.0. Strasbourg: Council of Europe
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.-M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Pauwels, L., Witters, E., Puga, M.I., Paz-Ares, J., Goossens, A., Reymond, P., De Jaeger, G., Solano, R., 2011. The *Arabidopsis* bHLH Transcription Factors MYC3 and MYC4 Are Targets of JAZ Repressors and Act Additively with MYC2 in the Activation of Jasmonate Responses. *Plant*

- Filipović, B., Šiler, B., Nestorović Živković, J., Banjanac, T., Skorić, M., Božunović, J., Mišić, D., 2019a. Diploid vs. tetraploid *Centaureum erythraea* Rafn: a comparative study of regenerative in vitro potential and biosynthetic capacity. *Lek. Sirovine* 39, 53. <https://doi.org/10.5937/leksir1939053F>
- Finkelstein, R., 2013. Abscisic Acid Synthesis and Response. *Arab. B.* 11, e0166. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Fleming, H.P., Walter, W.M., Etchells, J.L., 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Appl. Microbiol.* 26, 777–82.
- Fonseca, S., Chico, J.M., Solano, R., 2009. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 539–547. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.013>
- Forslund, K., Morant, M., Jørgensen, B., Olsen, C.E., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Bak, S., 2004. Biosynthesis of the nitrile glucosides rhodiocyanoside A and D and the cyanogenic glucosides lotaustralin and linamarin in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 135, 71–84. <https://doi.org/10.1104/pp.103.038059>
- Fragoso, V., Rothe, E., Baldwin, I.T., Kim, S.G., 2014. Root jasmonic acid synthesis and perception regulate folivore-induced shoot metabolites and increase *Nicotiana attenuata* resistance. *New Phytol.* 202, 1335–1345. <https://doi.org/10.1111/nph.12747>
- Freiesleben, H.S., Jager, K.A., 2014. Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms—A Review. *Med. Aromat. Plants* 03. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000154>
- Freire-Moran, L., Aronsson, B., Manz, C., Gyssens, I.C., So, A.D., Monnet, D.L., Cars, O., 2011. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria - Time to react is now. *Drug Resist. Updat.* 14, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.02.003>
- Fujii, M., Kuramochi, T., Nakakuki, Y., Hatazawa, R., Konno, K., Munakata, T., Hirai, Y., 2019. Synthesis of gentianine N-oxide by enzymatic hydrolysis of swertiamarin in the presence of hydroxylamine and reaction pathway to gentianine and gentianol. *Tetrahedron Lett.* 60, 721–725. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.01.061>
- Galindo, L.A., De Moraes Pultrini, A., Costa, M., 2010. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *J. Nat. Med.* 64, 436–441. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0429-2>
- Garrido-Bigotes, A., Figueroa, N.E., Figueroa, P.M., Figueroa, C.R., 2018. Jasmonate signalling pathway in strawberry: Genome-wide identification, molecular characterization and expression of JAZs and MYCs during fruit development and ripening. *PLoS One* 13, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197118>
- Gasic, K., Hernandez, A., Korban, S.S., 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Report.* 22, 437–438.
- Geerlings, A., Martinez-Lozano Ibañez, M., Memelink, J., Van Der Heijden, R., Verpoorte, R., 2000. Molecular cloning and analysis of strictosidine β -D-glucosidase, an enzyme in terpenoid

indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. J. Biol. Chem. 275, 3051–3056. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3051>

Geng, C.A., Huang, X.Y., Ma, Y.B., Zhang, X.M., Chen, J.J., 2015. Synthesis of erythrocentaurin derivatives as a new class of hepatitis B virus inhibitors. Bioorganic Med. Chem. Lett. 25, 1568–1571. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.02.009>

Georgiev, V., Ivanov, I., Berkov, S., Pavlov, A., 2011. Alkaloids biosynthesis by *Pancreaticum maritimum* L. shoots in liquid culture. Acta Physiol. Plant. 33, 927–933. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0622-7>

Geu-Flores, F., Sherden, N.H., Glenn, W.S., O'connor, S.E., Courdavault, V., Burlat, V., Nims, E., Wu, C., Cui, Y., 2012. An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis. Nature 492, 138–142. <https://doi.org/10.1038/nature11692>

Ghisalberti, E.L., 1998. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. Phytomedicine 5, 147–163. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80012-3](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80012-3)

Goklany, S., Rizvi, N.F., Loring, R.H., Cram, E.J., Lee-Parsons, C.W.T., 2013. Jasmonate-dependent alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures is correlated with the relative expression of Orca and Zct transcription factors. Biotechnol. Prog. 29, 1367–1376. <https://doi.org/10.1002/btpr.1801>

Gómez-Anduro, G., Cenicerros-Ojeda, E.A., Casados-Vázquez, L.E., Bencivenni, C., Sierra-Beltrán, A., Murillo-Amador, B., Tiessen, A., 2011. Genome-wide analysis of the beta-glucosidase gene family in maize (*Zea mays* L. var B73). Plant Mol. Biol. 77, 159–183. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9800-2>

Gonzales-Burgos, E., Gomez-Serranillos, M., 2012. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. Curr. Med. Chem. 19.

Goossens, J., Fernández-Calvo, P., Schweizer, F., Goossens, A., 2016. Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses. Plant Mol. Biol. 91, 673–689. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0480-9>

Guillermo Avila, J., De Liverant, J.G., Martínez, A., Martínez, G., Muñoz, J.L., Arciniegas, A., Romo De Vivar, A., 1999. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol. 66, 75–78. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00203-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00203-7)

Guirimand, G., Courdavault, V., Lanoue, A., Mahroug, S., Guihur, A., Blanc, N., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B., Burlat, V., 2010. Strictosidine activation in Apocynaceae: Towards a “nuclear time bomb”? BMC Plant Biol. 10, 1–20. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-182>

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, in: Nucleic Acids Symposium Series. pp. 95–98.

Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. Biochem. Soc. Trans. 35, 1147–1150.

Hammerschmidt, R., Schultz, J.C., 1996. Multiple Defenses and Signals in Plant Defense against Pathogens and Herbivores, in: Romeo, J.T., Saunders, J.A., Barbosa, P. (Eds.), Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions. Springer US, Boston, MA, pp. 121–154. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1754-6_5

- Han, H., Zeng, W., He, C., Bligh, S.W.A., Liu, Q., Yang, L., Wang, Z., 2014. Characterization of metabolites of sweroside in rat urine using ultra-high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and NMR spectroscopy. *J. Mass Spectrom.* 49, 1108–1116. <https://doi.org/10.1002/jms.3429>
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S., 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 845–850.
- Hannemann, L., Lucaciu, C.R., Sharma, S., Rattei, T., Mayer, K.F.X., Gierl, A., Frey, M., 2018. A promiscuous beta-glucosidase is involved in benzoxazinoid deglycosylation in *Lamium galeobdolon*. *Phytochemistry* 156, 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.012>
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chem.* 173, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Herrmann, K.M., Weaver, L.M., 1999. the Shikimate Pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>
- Himeno, N., Saburi, W., Wakuta, S., Takeda, R., Matsuura, H., Nabeta, K., Sansenya, S., Ketudat Cairns, J.R., Mori, H., Imai, R., Matsui, H., 2013. Identification of rice β -glucosidase with high hydrolytic activity towards salicylic acid β -d-glucoside. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 934–939. <https://doi.org/10.1271/bbb.120889>
- Horváth, G., Kovács, K., Kocsis, B., Kustos, I., 2009. Effect of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and its main constituents on the outer membrane protein composition of erwinia strains studied with microfluid chip technology. *Chromatographia* 70, 1645–1650. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1374-7>
- Hua, W., Zheng, P., He, Y., Cui, L., Kong, W., Wang, Z., 2014. An insight into the genes involved in secoiridoid biosynthesis in *Gentiana macrophylla* by RNA-seq. *Mol. Biol. Rep.* 41, 4817–4825. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3352-x>
- Hua, Y., Sansenya, S., Saetang, C., Wakuta, S., Cairns, J.R.K., 2013. Enzymatic and structural characterization of hydrolysis of gibberellin A4 glucosyl ester by a rice β -D-glucosidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 537, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.06.005>
- Huang, X.J., Li, J., Mei, Z.Y., Chen, G., 2016. Gentiopicroside and sweroside from *Veratrum baillonii* Franch. induce phosphorylation of Akt and suppress Pck1 expression in hepatoma cells. *Biochem. Cell Biol.* 94, 270–278. <https://doi.org/10.1139/bcb-2015-0173>
- Ibanez, F., Bang, W.Y., Lombardini, L., Cisneros-Zevallos, L., 2019. Solving the controversy of healthier organic fruit: Leaf wounding triggers distant gene expression response of polyphenol biosynthesis in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*). *Sci. Rep.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55033-w>
- Ilc, T., Parage, C., Boachon, B., Navrot, N., Werck-Reichhart, D., 2016. Monoterpenol Oxidative Metabolism: Role in Plant Adaptation and Potential Applications. *Front. Plant Sci.* 7, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00509>
- Innocenti, M., Marca, G. la, Malvagia, S., Giaccherini, C., Vincieri, F.F., Mulinacci, N., 2006.

Electrospray ionisation tandem mass spectrometric investigation of phenylpropanoids and secoiridoids from solid olive residue. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2013–2022. <https://doi.org/10.1002/rcm.2556>

Inouye, H., Nakamura, Y., 1971. Über die monoterpenglucoside und verwandte naturstoffe XIV: Die struktur der beiden stark bitter schmeckenden glucoside amarogentin und amaroswerin aus *Swertia japonica*. *Tetrahedron* 27, 1951–1966.

Inouye, H., Ueda, S., Nakamura, Y., 1970. Studies on monoterpene glucosides. XII. Biosynthesis of gentianaceous secoiridoid glucosides. *Chem. Pharm. Bull.* 18, 2043–2049.

Inouye, H., Ueda, S., Nakamura, Y., 1967. Zur Biosynthese der bitteren Glucoside der Gentianazeen, des Gentiopicrosids, des Swertiamarins und des swerosids. *Tetrahedron Lett.* 8, 3221–3226.

Irmeler, S., Schröder, G., St-Pierre, B., Crouch, N.P., Hotze, M., Schmidt, J., Strack, D., Matern, U., Schröder, J., 2000. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: New enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J.* 24, 797–804. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00922.x>

Ishiguro, K., Yamaki, M., Takagi, S., 1983. Studies on Iridoid-related Compounds III: Gentiopical, the Aglucone of Gentiopicroside. *Planta Med.* 49, 208–210. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969852>

Ishiguro, K., Yamaki, M., Takagi, S., 1982. Studies on the iridoid related compounds. I. On the antimicrobial activity of aucubigenin and certain iridoid aglycones. *J. Pharm. Soc. Japan* 102, p755-759.

Ishiguro, K., Yamaki, M., Takagi, S., Ikeda, Y., Kawakami, K., Ito, K., Nose, T., 1986. Studies on iridoid-related compounds. IV.: Antitumor activity of iridoid aglycones. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 2375–2379.

Jablonická, V., Ziegler, J., Vatehová, Z., Lišková, D., Heilmann, I., Obložinský, M., Heilmann, M., 2018. Inhibition of phospholipases influences the metabolism of wound-induced benzylisoquinoline alkaloids in *Papaver somniferum* L. *J. Plant Physiol.* 223, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.01.007>

Jacobo-Velázquez, D.A., González-Aguero, M., Cisneros-Zevallos, L., 2015. Cross-talk between signaling pathways: The link between plant secondary metabolite production and wounding stress response. *Sci. Rep.* 5, 8608. <https://doi.org/10.1038/srep08608>

Jaishree, V., Badami, S., Rupesh Kumar, M., Tamizhmani, T., 2009. Antinociceptive activity of swertiamarin isolated from *Enicostemma axillare*. *Phytomedicine* 16, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.09.010>

Jensen, S.R., Schripsema, J., 2002. Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae, in: *Gentianaceae - Systematics and Natural History*. pp. 573–631.

Jones, P., Vogt, T., 2001. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: Tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213, 164–174. <https://doi.org/10.1007/s004250000492>

Jun, C., Xue-Ming, Z., Chang-Xiao, L., Tie-Jun, Z., 2008. Structure elucidation of metabolites of swertiamarin produced by *Aspergillus niger*. *J. Mol. Struct.* 878, 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2007.07.031>

- Kan, Y., Uçan, U.S., Kartal, M., Altun, M.L., Aslan, S., Sayar, E., Ceyhan, T., 2006. GC-MS analysis and antibacterial activity of cultivated *Satureja cuneifolia* Ten. essential oil. Turkish J. Chem. 30, 253–259.
- Kantham, L., 1985. P-G I u cosid ase of *Penicilfium funiculosum* . II . Properties and Mycelial Binding * XXVII, 6–11.
- Karuppusamy, S., 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. J. Med. Plants Res. 3, 1222–1239.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M., 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chem. 94, 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>
- Katoh, E., Toda, Y., Ando, T., Kurotani, K., Miyao, A., Habu, Y., Hattori, T., Sugimoto, K., Mitsuda, N., Takeda, S., Ogawa, D., Tanaka, M., Hirochika, H., Kurata, K., Abe, K., 2013. RICE SALT SENSITIVE3 Forms a Ternary Complex with JAZ and Class-C bHLH Factors and Regulates Jasmonate-Induced Gene Expression and Root Cell Elongation. Plant Cell 25, 1709–1725. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.112052>
- Ketudat Cairns, J.R., Mahong, B., Baiya, S., Jeon, J.S., 2015. β -Glucosidases: Multitasking, moonlighting or simply misunderstood? Plant Sci. 241, 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.014>
- Kidd, T., Easson, M.L., Qu, Y., Jones, G., De Luca, V., 2019. Inter-organ transport of secologanin allows assembly of monoterpenoid indole alkaloids in a *Catharanthus roseus* mutant. Phytochemistry 159, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.12.017>
- Koes, R.E., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M., 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. BioEssays 16, 123–132.
- Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., Nakamura, M., 1999. Enzymatic activation of oleuropein: A protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 9159–9164. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9159>
- Koo, A.J.K., Gao, X., Daniel Jones, A., Howe, G.A., 2009. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. Plant J. 59, 974–986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03924.x>
- Koudounas, K., Banilas, G., Michaelidis, C., Demoliou, C., Rigas, S., Hatzopoulos, P., 2015. A defence-related *Olea europaea* β -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent. J. Exp. Bot. 66, 2093–2106. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv002>
- Kries, H., Caputi, L., Stevenson, C.E.M., Kamileen, M.O., Sherden, N.H., Geu-Flores, F., Lawson, D.M., O'Connor, S.E., 2016. Structural determinants of reductive terpene cyclization in iridoid biosynthesis. Nat. Chem. Biol. 12, 6–8. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1955>
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food Bioprod. Process. 89, 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- Krogh, K.B.R., Mørkeberg, A., Jørgensen, H., Frisvad, J.C., Olsson, L., 2004. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol. 114, 389–401. <https://doi.org/10.1385/ABAB:114:1-3:389>

- Kubo, I., Matsumoto, A., Takase, I., 1985. A multichemical defense mechanism of bitter olive *Olea europaea* (Oleaceae). *J. Chem. Ecol.* 11, 251–263. <https://doi.org/10.1007/BF00988207>
- Kucharska, A.Z., Fecka, I., 2016. Identification of iridoids in edible honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest.) by UPLC-ESI-qTOF-MS/MS. *Molecules* 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21091157>
- Kulevanova, S., Stefova, M., Panovska, T.K., Stafilov, T., 2003. HPLC identification and determination of myricetin, quercetin, kaempferol and total flavonoids in herbal drugs. *Maced. Pharm. Bull.* 30, 25–30.
- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P.J., Jaspars, M., Sarker, S.D., 2003. Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaureum erythraea*. *Phytomedicine* 10, 344–347. <https://doi.org/10.1078/094471103322004857>
- Lachke, A.H., Bastawde, K.B., Powar, V.K., Srinivasan, M.C., 1983. Enhanced production of extracellular β -glucosidase by *Penicillium funiculosum* in submerged culture. *Biotechnology Letters* 5, 649–652. <https://doi.org/10.1007/BF01386356>
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, 453–462.
- Lattanzio, V., 2013. Phenolic Compounds: Introduction, in: K.G. Ramawat, J.M. Mérillon (Eds.) *Natural products - Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Springer 546 Verlag Berlin Heidelberg 2013, pp. 1543-1580.
- Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H.Y., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, Ildoo, Kwak, J.M., Lee, I.J., Hwang, Inhwan, 2006. Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. *Cell* 126, 1109–1120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.034>
- León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J., 2001. Wound signalling in plants. *Exp. Bot.* 52, 1–9.
- Lewis, K., Ausubel, F.M., 2006. Prospects for plant-derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* 24, 1504–1507. <https://doi.org/10.1038/nbt1206-1504>
- Li, Y., Liu, Y., Liu, R., Liu, S., Zhang, X., Wang, Z., Zhang, J., Lu, J., 2015. HPLC-LTQ-orbitrap MSⁿ profiling method to comprehensively characterize multiple chemical constituents in xiao-er-qing-jie granules. *Anal. Methods* 7, 7511–7526. <https://doi.org/10.1039/C5AY00420A>
- Lin, C.H., Wei, Y.T., Chou, C.C., 2006. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. *Food Microbiol.* 23, 628–633. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.12.004>
- Liu, Y., Wang, Y., Guo, F., Zhan, L., Mohr, T., Cheng, P., Huo, N., Gu, R., Pei, D., Sun, J., Tang, L., Long, C., Huang, L., Gu, Y.Q., 2017. Deep sequencing and transcriptome analyses to identify genes involved in secoiridoid biosynthesis in the Tibetan medicinal plant *Swertia mussotii*. *Sci. Rep.* 7, 43108. <https://doi.org/10.1038/srep43108>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta}$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Luo, Y.D., Chen, J., Cao, J., Wen, X.D., Li, P., 2009. Determination of Sweroside in Rat Plasma and Bile for Oral Bioavailability and Hepatobiliary Excretion. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 57, 79–83. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.79>
- Maciejewska, B., Kopcewicz, J., 2002. Inhibitory effect of methyl jasmonate on flowering and elongation growth in *Pharbitis nil*. *J. Plant Growth Regul.* 21, 216–223. <https://doi.org/10.1007/s003440010061>
- Maffei, M.E., Mithöfer, A., Boland, W., 2007. Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends Plant Sci.* 12, 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.001>
- Mahendran, G., Manoj, M., Prasad, K.J.R., Bai, V.N., 2013. *Academic Sciences* 3321, 523–529.
- Malkov, S., Simonović, A., 2011. Shotgun assembly of *Centaurium erythraea* transcriptome. In: 19th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, pp. 16.
- Malook, S.U., Qi, J., Hettenhausen, C., Xu, Y., Zhang, C., Zhang, J., Lu, C., Li, J., Wang, L., Wu, J., 2019. The oriental armyworm (*Mythimna separata*) feeding induces systemic defence responses within and between maize leaves. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 374, 20180307. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0307>
- Mano, Y., Nemoto, K., 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 63, 2853–2872. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers091>
- Mansar-Benhamza, L., Djerrou, Z., Hamdi Pacha, Y., 2013. Evaluation of anti-hyperglycemic activity and side effects of *Erythraea centaurium* (L.) Pers. in rats. *African J. Biotechnol.* 12, 6980–6985. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13322>
- Mansoor, A., Samad, A., Zaidi, M.I., Aftab, K., 1998. Hypotensive effect of *Gentiana olivieri* and its alkaloid gentianine in rats. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 4, 229–230. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb00340.x>
- Marak, H.B., Biere, A., Van Damme, J.M.M., 2002a. Two herbivore-deterrent iridoid glycosides reduce the in-vitro growth of a specialist but not of a generalist pathogenic fungus of *Plantago lanceolata* L. *Chemoecology* 12, 185–192. <https://doi.org/10.1007/PL00012667>
- Marak, H.B., Biere, A., Van Damme, J.M.M., 2002b. Systemic, genotype-specific induction of two herbivore-deterrent iridoid glycosides in *Plantago lanceolata* L. in response to fungal infection by *Diaporthe adunca* (ROB.) niessel. *J. Chem. Ecol.* 28, 2429–2448. <https://doi.org/10.1023/A:1021475800765>
- Marchyshyn, S.M., Stoyko, L.I., 2014. Definition phenolic compounds in herbs *Centaurium erythraea* Rafn HPLC. *Фармацевтичний часопис* 0. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2014.1.2879>
- Marcinowski, S., Grisebach, H., 1978. Enzymology of Lignification: Cell-Wall-bound β -Glucosidase for Coniferin from Spruce (*Picea abies*) Seedlings. *Eur. J. Biochem.* 87, 37–44.
- Matekalo, D., Skorić, M., Nikolić, T., Novaković, L., Lukić, M., Božunović, J., Aničić, N., Filipović, B., Mišić, D., 2018. Organ-specific and genotype-dependent constitutive biosynthesis of secoiridoid glucosides in *Centaurium erythraea* Rafn, and its elicitation with methyl jasmonate. *Phytochemistry* 155, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.015>

- Matkowski, A., 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnol. Adv.* 26, 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001>
- Matsuura, H.N., Rau, M.R., Fett-Neto, A.G., 2014. Oxidative stress and production of bioactive monoterpene indole alkaloids: Biotechnological implications. *Biotechnol. Lett.* 36, 191–200. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1348-6>
- Maury, S., Geoffroy, P., Legrand, M., 1999. Tobacco O-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism. The different caffeoyl-coenzyme A/5-hydroxyferuloyl-coenzyme A 3/5-O-methyltransferase and caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns. *Plant Physiol.* 121, 215–223. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.215>
- Meelaph, T., Kobtrakul, K., Chansilpa, N.N., Han, Y., Rani, D., De-Eknamkul, W., Vimolmangkang, S., 2018. Coregulation of Biosynthetic Genes and Transcription Factors for Aporphine-Type Alkaloid Production in Wounded Lotus Provides Insight into the Biosynthetic Pathway of Nuciferine. *ACS Omega* 3, 8794–8802. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00827>
- Memelink, J., Gantet, P., 2007. Transcription factors involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochem. Rev.* 6, 353–362. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9051-z>
- Miettinen, K., Dong, L., Navrot, N., Schneider, T., Burlat, V., Pollier, J., Woittiez, L., van der Krol, S., Lugan, R., Ilc, T., Verpoorte, R., Oksman-Caldentey, K.-M., Martinoia, E., Bouwmeester, H., Goossens, A., Memelink, J., Werck-Reichhart, D., 2014. The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus*. *Nat. Commun.* 5, 3606. <https://doi.org/10.1038/ncomms4606>
- Mišić, D., Šiler, B., Gašić, U., Avramov, S., Živković, S., Nestorović Živković, J., Milutinović, M., Tešić, Ž., 2015. Simultaneous UHPLC/DAD/(+/-) HESI--MS/MS Analysis of Phenolic Acids and Nepetalactones in Methanol Extracts of *Nepeta* Species: A Possible Application in Chemotaxonomic Studies. *Phytochem. Anal.* 26, 72–85.
- Mithöfer, A., Wanner, G., Boland, W., 2005. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiol.* 137, 1160–1168. <https://doi.org/10.1104/pp.104.054460>
- Morant, A.V., Bjarnholt, N., Kragh, M.E., Kjærgaard, C.H., Jørgensen, K., Paquette, S.M., Piotrowski, M., Imberty, A., Olsen, C.E., Møller, B.L., Bak, S., 2008. The β -glucosidases responsible for bioactivation of hydroxynitrile glucosides in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 147, 1072–1091. <https://doi.org/10.1104/pp.107.109512>
- Mortensen, S., Weaver, J.D., Sathitloetsakun, S., Cole, L.F., Rizvi, N.F., Cram, E.J., Lee-Parsons, C.W.T., 2019. The regulation of ZCT1, a transcriptional repressor of monoterpene indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Direct* 3, 1–13. <https://doi.org/10.1002/pld3.193>
- Mroueh, M., Saab, Y., Rizkallah, R., 2004. Hepatoprotective Activity of *Centaurium erythraea* on Acetaminophen-induced Hepatotoxicity in Rats. *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.* 18, 431–433.
- Munkert, J., Pollier, J., Miettinen, K., Van Moerkercke, A., Payne, R., Müller-Uri, F., Burlat, V., O'Connor, S.E., Memelink, J., Kreis, W., Goossens, A., 2015. Iridoid synthase activity is

common among the plant progesterone 5 β -reductase family. *Mol. Plant* 8, 136–152. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.005>

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15, 473–497.

Murata, J., Roepke, J., Gordon, H., De Luca, V., 2008. The leaf epidermome of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *Plant Cell* 20, 524–542. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056630>

Nakata, M., Mitsuda, N., Herde, M., Koo, A.J.K., Moreno, J.E., Suzuki, K., Howe, G.A., Ohme-Takagi, M., 2013. A bHLH-Type Transcription Factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, Acts as a Repressor to Negatively Regulate Jasmonate Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 1641–1656. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111112>

Negi, J.S., Bisht, V.K., Singh, P., Rawat, M.S.M., Joshi, G.P., 2013. Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology. *J. Appl. Chem.* 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/621459>

Nespolo, M., 2017. Free Radicals in Biology and Medicine. Fifth Edition. by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. Oxford University Press, 2015. Pp. xxxviii + 905. Price GBP 70.00 (paperback, ISBN 9780198717485), GBP 125.00 (hardback, ISBN 9780198717478). *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 73, 384–385. <https://doi.org/10.1107/S2059798317004533>

Newsholme, P., Cruzat, V.F., Keane, K.N., Carlessi, R., De Bittencourt, P.I.H., 2016. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem. J.* 473, 4527–4550. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>

Nikus, J., Esen, A., Jonsson, L.M.V., 2003. Cloning of a plastidic rye (*Secale cereale*) β -glucosidase cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Physiol. Plant.* 118, 337–345. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00118.x>

Nishanth, M.J., Sheshadri, S.A., Rathore, S.S., Srinidhi, S., Simon, B., 2018. Expression analysis of Cell wall invertase under abiotic stress conditions influencing specialized metabolism in *Catharanthus roseus*. *Sci. Rep.* 8, 15059. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33415-w>

Nozaka, T., Watanabe, F., Ishino, M., Morimoto, I., Kondoh, H., Koyama, K., Natori, S., 1989. A mutagenic new iridoid in the water extract of catalpae fructus. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 2838–2840.

Obied, H.K., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., 2007. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 603, 176–189. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.09.044>

Ogasawara, K., Yamada, K., Christeller, J.T., Kondo, M., Hatsugai, N., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., 2009. Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β -glucosidases. *Plant Cell Physiol.* 50, 480–488. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp007>

Olaimat, A.N., Al-Holy, M.A., Shahbaz, H.M., Al-Nabulsi, A.A., Abu Ghoush, M.H., Osaili, T.M., Ayyash, M.M., Holley, R.A., 2018. Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 1277–1292. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12387>

- Opassiri, R., Pomthong, B., Onkoksoong, T., Akiyama, T., Esen, A., Ketudat Cairns, J.R., 2006. Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 β -glucosidase. *BMC Plant Biol.* 6, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-33>
- Otieno, D.O., Shah, N.P., 2007. Endogenous β -glucosidase and β -galactosidase activities from selected probiotic micro-organisms and their role in isoflavone biotransformation in soymilk. *J. Appl. Microbiol.* 103, 910–917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03438.x>
- Padhan, J.K., Kumar, V., Sood, H., Singh, T.R., Chauhan, R.S., 2015. Contents of therapeutic metabolites in *Swertia chirayita* correlate with the expression profiles of multiple genes in corresponding biosynthesis pathways. *Phytochemistry* 116, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.007>
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pankoke, H., Buschmann, T., Müller, C., 2013. Role of plant β -glucosidases in the dual defense system of iridoid glycosides and their hydrolyzing enzymes in *Plantago lanceolata* and *Plantago major*. *Phytochemistry* 94, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.04.016>
- Pankoke, H., Gehring, R., Müller, C., 2015. Impact of the dual defence system of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) on performance, nutrient utilisation and feeding choice behaviour of *Amata mogadorensis* larvae (Lepidoptera, Erebidae). *J. Insect Physiol.* 82, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.08.006>
- Paul, P., Singh, S.K., Patra, B., Sui, X., Pattanaik, S., Yuan, L., 2016. A differentially regulated AP2/ERF transcription factor gene cluster acts downstream of a MAP kinase cascade to modulate terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *New Phytol.* 213, 1107–1123. <https://doi.org/10.1111/nph.14252>
- Pavlović, A. V., Papetti, A., Zagorac, D.Č.D., Gašić, U.M., Mišić, D.M., Tešić, Ž.L., Natić, M.M., 2016. Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia. *Ind. Crops Prod.* 87, 304–314. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.052>
- Pentzold, S., Zagrobelny, M., Rook, F., Bak, S., 2014. How insects overcome two-component plant chemical defence: Plant β -glucosidases as the main target for herbivore adaptation. *Biol. Rev.* 89, 531–551. <https://doi.org/10.1111/brv.12066>
- Petkov, V., Manolov, P., 1978. Pharmacological studies on substances of plant origin with coronary dilatating and antiarrhythmic action. *Am. J. Chin. Med.* 6, 123–130.
- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., Vianello, A., 2013. Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14950–14973. <https://doi.org/10.3390/ijms140714950>
- Phillips, M.A., Savage, T.J., Croteau, R., 1999. Monoterpene synthases of loblolly pine (*Pinus taeda*) produce pinene isomers and enantiomers. *Arch. Biochem. Biophys.* 372, 197–204.
- Phillipson, J.D., O'Neill, M.J., 1989. New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules.
- Piatczak, E., Wielanek, M., Wysokinska, H., 2005. Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. *Plant Sci.* 168, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.08.013>

- Piątczak, E., Wysokińska, H., 2003. In vitro regeneration of *Centaureum erythraea* Rafn from shoot tips and other seedling explants. *Acta Soc. Bot. Pol.* 72, 283–288. <https://doi.org/10.5586/asbp.2003.036>
- Pichersky, E., Gang, D.R., 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 5, 439–445. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01741-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01741-6)
- Poulton, J.E., 1990. Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol.* 94, 401–405. <https://doi.org/10.1104/pp.94.2.401>
- Prasad, A., Sedlářová, M., Balukova, A., Rác, M., Pospíšil, P., 2020. Reactive Oxygen Species as a Response to Wounding: In Vivo Imaging in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01660>
- Predieri, S., Rapparini, F., 2007. Terpene emission in tissue culture. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 91, 87–95. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9250-3>
- Puttick, M.G., Bowers, M.D., 1988. Effect of qualitative and quantitative variation in allelochemicals on a generalist insect: Iridoid glycosides and the southern armyworm. *J. Chem. Ecol.* 14, 335–351.
- Radušienė, J., 1995. Biological peculiarities and possibilities of introduction of *Centaureum erythraea* Rafn. *Biologija* 3, 55–57.
- Ramani, G., Meera, B., Rajendhran, J., Gunasekaran, P., 2014. Transglycosylating glycoside hydrolase family 1 β -glucosidase from *Penicillium funiculosum* NCL1: Heterologous expression in *Escherichia coli* and characterization. *Biochem. Eng. J.* 102, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.018>
- Ramani, G., Meera, B., Vanitha, C., Rao, M., Gunasekaran, P., 2012. Production, Purification, and Characterization of a β -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 959–972. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9645-4>
- Rather, G.A., Sharma, A., Misra, P., Kumar, A., Kaul, V., Lattoo, S.K., 2019. Molecular characterization and overexpression analyses of secologanin synthase to understand the regulation of camptothecin biosynthesis in *Nothapodytes nimmoniana* (Graham.) Mabb. *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01440-9>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E., 2000a. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 707–719. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.5.707>
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.
- Riou, C., Salmon, J.-M., Vallier, M.-J., Günata, Z., Barre, P., 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3607–3614.

- Roepke, J., Gordon, H.O.W., Neil, K.J.A., Gidda, S., Mullen, R.T., Freixas Coutin, J.A., Bray-Stone, D., Bozzo, G.G., 2017. An apoplastic β -glucosidase is essential for the degradation of flavonol 3-O- β -Glucoside-7-O- α -rhamnosides in arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 58, 1030–1047. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx050>
- Rojas Molina, M.A., Bah, M., Rojas, J.I., Gutiérrez, D.M., 2000. Smooth muscle relaxing activity of gentiopicroside isolated from *Gentiana spathacea*. *Planta Med.* 66, 765–767. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9774>
- Rombouts, J.E., Links, J., 1956. The chemical nature of the antibacterial substance present in *Aucuba japonica* thunbg. *Experientia* 12, 78–80. <https://doi.org/10.1007/BF02164691>
- Rouyi, C., Baiya, S., Lee, S.K., Mahong, B., Jeon, J.S., Ketudat- Cairns, J.R., Ketudat-Cairns, M., 2014. Recombinant expression and characterization of the cytoplasmic rice β -glucosidase Os1BGlU4. *PLoS One* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096712>
- Ryu, K.H., Rhee, H.I., Kim, J.H., Yoo, H., Lee, B.Y., Um, K.A., Kim, K., Noh, J.Y., Lim, K.M., Chung, J.H., 2010. Anti-inflammatory and analgesic activities of SKLJI, a highly purified and injectable herbal extract of *Lonicera japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 2022–2028. <https://doi.org/10.1271/bbb.100279>
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Salazar, R., Pozos, M.E., Cordero, P., Perez, J., Salinas, M.C., Waksman, N., 2008. Determination of the antioxidant activity of plants from northeast Mexico. *Pharm. Biol.* 46, 166–170. <https://doi.org/10.1080/13880200701498952>
- Sanchez-Serrano, J.J., 2017. Plant Responses to Wounding, in: ELS. American Cancer Society, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001321.pub2>
- Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S., Kamiya, Y., Ohta, H., Shirasu, K., 2013. Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 Are Negative Regulators of Jasmonate Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 163, 291–304. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220129>
- Savatin, D. V., Gramegna, G., Modesti, V., Cervone, F., 2014. Wounding in the plant tissue : the defense of a dangerous passage. *Front. Plant Sci.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00470>
- Schenck, C.A., Maeda, H.A., 2018. Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry* 149, 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.003>
- Schönbeck, F., Schlösser, E., 1976. Preformed Substances as Potential Protectants, in: Heitefuss, R., Williams, P.H. (Eds.), *Physiological Plant Pathology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 653–678. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66279-9_24
- Schweizer, F., Colinas, M., Pollier, J., Van Moerkercke, A., Vanden Bossche, R., de Clercq, R., Goossens, A., 2018. An engineered combinatorial module of transcription factors boosts production of monoterpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Metab. Eng.* 48, 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.016>
- Sefi, M., Fetoui, H., Lachkar, N., Tahraoui, A., Lyoussi, B., Boudawara, T., Zeghal, N., 2011.

Centaurium erythraea (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *J. Ethnopharmacol.* 135, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.02.029>

Setchell, K.D.R., 2000. Third International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease Absorption and Metabolism of Soy Isoflavones — from Food to Dietary Supplements and Adults to Infants 1, 2 654–655.

Shaik, N.M., Misra, A., Singh, S., Fatangare, A.B., Ramakumar, S., Rawal, S.K., Khan, B.M., 2013. Functional characterization, homology modeling and docking studies of β -glucosidase responsible for bioactivation of cyanogenic hydroxynitrile glucosides from *Leucaena leucocephala* (subabul). *Mol. Biol. Rep.* 40, 1351–1363. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2179-6>

Shao, H.B., Guo, Q.J., Chu, L.Y., Zhao, X.N., Su, Z.L., Hu, Y.C., Cheng, J.F., 2007. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 54, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.07.002>

Shewale, J.G., 1982. β -Glucosidase: Its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *Int. J. Biochem.* 14, 435–443. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(82\)90109-4](https://doi.org/10.1016/0020-711X(82)90109-4)

Sibanda, T., Okoh, A.I., 2007. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African J. Biotechnol.* 6, 2886–2896. <https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2458>

Šiler, B., Avramov, S., Banjanac, T., Cvetković, J., Nestorović Živković, J., Patenković, A., Mišić, D., 2012. Secoiridoid glycosides as a marker system in chemical variability estimation and chemotype assignment of *Centaurium erythraea* Rafn from the Balkan Peninsula. *Ind. Crops Prod.* 40, 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.026>

Šiler, B., Mišić, D., Nestorović, J., Tijana, B., Glamočlija, J., Soković, M., Ćirić, A., 2010. Antibacterial and Antifungal Screening of *Centaurium pulchellum* Crude Extracts and Main Secoiridoid Compounds. *Nat. Prod. Commun.* 5, 1525–9475.

Šiler, B., Živković, S., Banjanac, T., Cvetković, J., Nestorović Živković, J., Ćirić, A., Soković, M., Mišić, D., 2014. Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chem.* 147, 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.007>

Simkin, A.J., Miettinen, K., Claudel, P., Burlat, V., Guirimand, G., Courdavault, V., Papon, N., Meyer, S., Godet, S., St-Pierre, B., Giglioli-Guivarc'H, N., Fischer, M.J.C., Memelink, J., Clastre, M., 2013. Characterization of the plastidial geraniol synthase from Madagascar periwinkle which initiates the monoterpenoid branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma. *Phytochemistry* 85, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.09.014>

Singh, A., Dwivedi, P., Padmanabh Dwivedi, C., 2018. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 7.1, 750–757.

Soković, M., Marin, P., Brkić, D., 2000. Antifungal activity of ethanolic extract from *Phlomis fruticosa* L. *Arch. Biol. Sci.* 52, 203–208.

Soković, M.D., Vukojević, J., Marin, P.D., Brkić, D.D., Vajs, V., Van Griensven, L.J.L.D., 2009. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal

activities. *Molecules* 14, 238–249. <https://doi.org/10.3390/molecules14010238>

- St-Pierre, B., Besseau, S., Clastre, M., Courdavault, V., Courtois, M., Crèche, J., Ducos, E., de Bernonville, T.D., Dutilleul, C., Glévarec, G., Imbault, N., Lanoue, A., Oudin, A., Papon, N., Pichon, O., Giglioli-Guivarc'h, N., 2013. Deciphering the evolution, cell biology and regulation of monoterpene indole alkaloids, *Advances in Botanical Research*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408061-4.00003-1>
- Stefkov, G., Miova, B., Dinevska-kjovkarovska, S., 2014. Chemical characterization of *Centaurium erythraea* L. and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 152, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.047>
- Stermitz, F.R., 1988. Iridoid glycosides and aglycones as chiral synthons, bioactive compounds, and lepidopteran defenses. In: Cutler, H.G. (Ed.), *Biological Active Natural Products, Symposium*. American Chemical Society, Washington DC, pp. 397–402
- Subotić, A., Grubišić, D., 2007. Histological analysis of somatic embryogenesis and adventitious shoot formation from root explants of *Centaurium erythraea* Gillib. *Biol. Plant.* 51, 514–516. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0109-6>
- Suryawanshi, S., Mehrotra, N., Asthana, R.K., Gupta, R.C., 2006. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric study and analysis of xanthone and secoiridoid glycoside composition of *Swertia chirata*, a potent antidiabetic. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 3761–3768. <https://doi.org/10.1002/rcm.2795>
- Takaichi, S., 2013. Tetraterpenes: Carotenoids, in: Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M. (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 3251–3283. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_141
- Talapatra, S.K., Talapatra, B., 2015. *Chemistry of plant natural products*. pp. 855-874. Berlin, Germany: Springer.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Team, R.C., 2018. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Tian, C., Cheng, Y., Zhang, T., Yang, X., 2017. Anti-mutagenicity of Swertiamarin and Its Metabolite in Incubated System of Human Intestinal Flora. *Chinese Herb. Med.* 9, 92–95. [https://doi.org/10.1016/S1674-6384\(17\)60082-0](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(17)60082-0)
- Tiwari, S., Verma, O.P., 2016. Isolation, partial purification, product formation and characterization of β -glucosidase from roots of *Hordeum vulgare* L. *Asian J. Bio Sci.* 11, 52–55. <https://doi.org/10.15740/has/ajbs/11.1/52-55>
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A.J., Howe, G.A., Gilroy, S., 2018. Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science.* 361, 1112 – 1115. <https://doi.org/10.1126/science.aat7744>
- Trifunović-Momčilov, M., Motyka, V., Dragičević, I., Petrić, M., Jevremović, S., Malbeck, J., Holík, J., Dobrev, P.I., Subotić, A., 2016. Endogenous Phytohormones in Spontaneously Regenerated *Centaurium erythraea* Rafn. *Plants Grown In Vitro. J. Plant Growth Regul.* 35, 543–552. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9558-x>

- Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., Noguchi, K., Ishiyama, M., Ezoe, T., Matsumoto, K., 2012. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *J. Microbiol. Methods* 90, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.05.001>
- Tuluçe, Y., Ozkol, H., Koyuncu, I., Ine, H., 2011. Gastroprotective effect of small centaury (*Centaureum erythraea* L) on aspirin-induced gastric damage in rats. *Toxicol. Ind. Health* 27, 760–768. <https://doi.org/10.1177/0748233710397421>
- Ubsdell, R.A.E., 1979. Studies on variation and evolution in *Centaureum erythraea* Rafn and *C. littorale* (D. Turner) Gilmour in the British Isles. 3. Breeding systems, floral biology and general discussion. *Watsonia* 12, 225–232.
- Ulanowska, K., Tkaczyk, A., Konopa, G., Węgrzyn, G., 2006. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.* 184, 271–278. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0063-7>
- Vaidya, H., Goyal, R.K., Cheema, S.K., 2013. Anti-diabetic activity of swertiamarin is due to an active metabolite, gentianine, that upregulates PPAR- γ gene expression in 3T3-L1 cells. *Phyther. Res.* 27, 624–627. <https://doi.org/10.1002/ptr.4763>
- Vaidya, H., Rajani, M., Sudarsanam, V., Padh, H., Goyal, R., 2009. Antihyperlipidaemic activity of swertiamarin, a secoiridoid glycoside in poloxamer-407-induced hyperlipidaemic rats. *J. Nat. Med.* 63, 437–442. <https://doi.org/10.1007/s11418-009-0350-8>
- Vaijanathappa, J., Badami, S., 2009. Antiedematogenic and free radical scavenging activity of swertiamarin isolated from *Encicostemma axillare*. *Planta Med.* 75, 12–17. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088333>
- Vaijanathappa, J., Puttaswamygowda, J., Bevanhalli, R., Dixit, S., Prabhakaran, P., 2020. Molecular docking, antiproliferative and anticonvulsant activities of swertiamarin isolated from *Encicostemma axillare*. *Bioorg. Chem.* 94, 103428. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103428>
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Bastos, M.L., 2001. Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3476–3479. <https://doi.org/10.1021/jf001145s>
- Van Der Sluis, W.G., Van Der Nat, J.M., Labadie, R.P., 1983. Thin-layer chromatographic bioassay of iridoid and secoiridoid glucosides with a fungitoxic aglucone moiety using β -glucosidase and the fungus *Penicillium expansum* as a test organism. *J. Chromatogr. A* 259, 522–526. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)88046-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88046-8)
- Van Moerkercke, A., Steensma, P., Gariboldi, I., Espoz, J., Purnama, P.C., Schweizer, F., Miettinen, K., Bossche, R. Vanden, Clercq, R. De, Memelink, J., Goossens, A., 2016. The basic helix-loop-helix transcription factor BIS2 is essential for monoterpene indole alkaloid production in the medicinal plant *Catharanthus roseus*. *Plant J.* 88, 3–12. <https://doi.org/10.1111/tbj.13230>
- Van Moerkercke, A., Steensma, P., Schweizer, F., Pollier, J., Gariboldi, I., Payne, R., Vanden Bossche, R., Miettinen, K., Espoz, J., Purnama, P.C., Kellner, F., Seppänen-Laakso, T., O'Connor, S.E., Rischer, H., Memelink, J., Goossens, A., 2015. The bHLH transcription factor

- BIS1 controls the iridoid branch of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 8130–8135. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504951112>
- Van Rossum, F., 2009. Succession stage variation in population size in an early-successional herb in a peri-urban forest. *Acta Oecologica* 35, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2008.11.005>
- Vázquez-Flota, F., Carrillo-Pech, M., Minero-García, Y., De Lourdes Miranda-Ham, M., 2004. Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.06.010>
- Venables, W.N., Ripley, B.D., 2013. *Modern applied statistics with S-PLUS*. Springer Science & Business Media.
- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 1, 13–25. <https://doi.org/10.1023/A:1015871916833>
- Von Dahl, C.C., Baldwin, I.T., 2007. Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. *J. Plant Growth Regul.* 26, 201–209. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-0014-4>
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>
- Wang, C.L., Liu, J.L., Liu, Z.L., Li, X.S., Cao, X.Y., 2009. Biomimetic transformation of gentiopicroside to erythrocentaurin. *Chinese Chem. Lett.* 20, 150–152. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2008.10.051>
- Wang, D., Xu, M., Zhu, H.T., Chen, K.K., Zhang, Y.J., Yang, C.R., 2007. Biotransformation of gentiopicroside by asexual mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 17, 3195–3197. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.03.022>
- Wang, J., Wu, D., Wang, Y., Xie, D., 2019. Jasmonate action in plant defense against insects. *J. Exp. Bot.* 1–10. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz174>
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C., 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
- Warnes, G.R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W.H.A., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., Moeller, S., Schwartz, M., Venables, B., 2016. *gplots: various R programming tools for plotting data*. R package version 3.0. 1. *Compr. R Arch. Netw.*
- Warzecha, H., Gerasimenko, I., Kutchan, T.M., Stöckigt, J., 2000. Molecular cloning and functional bacterial expression of a plant glucosidase specifically involved in alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 54, 657–666. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00175-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00175-8)
- Wasternack, C., Hause, B., 2013. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in

- Wasternack, C., Strnad, M., 2019. Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites — Pathways, transcription factors and applied aspects — A brief review. *N. Biotechnol.* 48, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.09.007>
- Wenjin, C., Jianwei, W., 2017. Protective Effect of Gentianine, a compound from Du Huo Ji Sheng Tang, against Freund's Complete Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *Inflammation* 40, 1401–1408. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0583-8>
- Winde, I., Wittstock, U., 2011. Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate-myrosinase system. *Phytochemistry* 72, 1566–1575. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.016>
- Wink, M., 2015. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines* 2, 251–286. <https://doi.org/10.3390/medicines2030251>
- Wink, M., 1999. Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Taylor & Francis.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105, 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
- Wu, J., Baldwin, I.T., 2009. Herbivory-induced signalling in plants: Perception and action. *Plant, Cell Environ.* 32, 1161–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01943.x>
- Xia, L., Ruppert, M., Wang, M., Panjkar, S., Lin, H., Rajendran, C., Barleben, L., Stöckigt, J., 2012. Structures of alkaloid biosynthetic glucosidases decode substrate specificity. *ACS Chem. Biol.* 7, 226–234. <https://doi.org/10.1021/cb200267w>
- Xu, H., Chang, K., Ma, L., Zheng, Y., Liu, X., 2012. Cloning and Characterization of the Strictosidine-(beta-D-glucosidase (SGD) Gene from *Rauvolfia verticillata*. *Hunan Agric Sci Technol* 13 (7), 1406-1409
- Xu, Z., Escamilla-Treviño, L.L., Zeng, L., Lalgondar, M., Bevan, D.R., Winkel, B.S.J., Mohamed, A., Cheng, C.L., Shih, M.C., Poulton, J.E., Esen, A., 2004. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol. Biol.* 55, 343–367. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0790-1>
- Xu, Z.Y., Lee, K.H., Dong, T., Jeong, J.C., Jin, J.B., Kanno, Y., Kim, D.H., Kim, S.Y., Seo, M., Bressan, R.A., Yun, D.J., Hwang, I., 2012. A vacuolar β -Glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 2184–2199. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095935>
- Yang, Z., Lasker, K., Schneidman-Duhovny, D., Webb, B., Huang, C.C., Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Meng, E.C., Sali, A., Ferrin, T.E., 2012. UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system. *J. Struct. Biol.* 179, 269–278.
- Yashin, A., Yashin, Y., Xia, X., Nemzer, B., 2017. Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A review. *Antioxidants* 6, 1–18. <https://doi.org/10.3390/antiox6030070>
- Zeng, W., Han, H., Tao, Y., Yang, L., Wang, Z., Chen, K., 2013. Identification of bio-active metabolites of gentiopicroside by UPLC/Q-TOF MS and NMR. *Biomed. Chromatogr.* 27, 1129–1136. <https://doi.org/10.1002/bmc.2917>

- Zeng, W.L., Li, W.K., Han, H., Tao, Y.Y., Yang, L., Wang, Z.T., Chen, K.X., 2014. Microbial biotransformation of gentiopicoside by the endophytic fungus *Penicillium crustosum* 2T01Y01. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 184–192. <https://doi.org/10.1128/AEM.02309-13>
- Zerbe, P., Bohlmann, J., 2015. Plant diterpene synthases: Exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. *Trends Biotechnol.* 33, 419–428. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.04.006>
- Zhang, G., Zhao, F., Chen, L., Pan, Y., Sun, L., Bao, N., Zhang, T., Cui, C.X., Qiu, Z., Zhang, Y., Yang, L., Xu, L., 2019. Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration. *Nat. Plants* 5, 491–497. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0408-x>
- Zhang, H., Hedhili, S., Montiel, G., Zhang, Y., Chatel, G., Pré, M., Gantet, P., Memelink, J., 2011. The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant J.* 67, 61–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04575.x>
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23, 283–333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>
- Zheng, H.H., Luo, C.T., Chen, H., Lin, J.N., Ye, C.L., Mao, S.S., Li, Y.L., 2014. Xanthones from *Swertia mussotii* as multitarget-directed antidiabetic agents. *ChemMedChem* 9, 1374–1377. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300507>
- Zhou, W., Ouyang, J., Wang, H., Wang, X., 2019. Antidermatophyte activity of the gentiopicoside-rich n-butanol fraction from *Gentiana siphonantha* maxim. Root on a Guinea pig model of dermatophytosis. *Complement. Med. Res.* 26, 31–38. <https://doi.org/10.1159/000492384>
- Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., 2011. Reactive Oxygen Species (ROS)--Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 711, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.02.015>
- Zubrická, D., Mišianiková, A., Henzelyová, J., Valletta, A., De Angelis, G., D'Auria, F.D., Simonetti, G., Pasqua, G., Čellárová, E., 2015. Xanthones from roots, hairy roots and cell suspension cultures of selected *Hypericum* species and their antifungal activity against *Candida albicans*. *Plant Cell Rep.* 34, 1953–1962. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1842-5>

8. ПРИЛОГ

1 M A I L K R S G R I V P S G A S M I S R G D F P A D F V F G
1 ATGGCAATTCTGAAAAGAAGTGGCCGGATTGTGCCTAGTGGTGCATCTATGATCAGCCCGGTGATTTCCAGCTGATTTTGTATTTCGGA
31 S A T A A Y Q V E G G A R E G G R G P S I W D T F T H R R P
91 TCAGCGACTGCAGCTTACCAGGTGGAAGGAGGGGCGCGTGAGGGTGGCGTGGCCCGAGTATATGGGACACTTCCACCCATAGACGACCT
61 D M I K G G G N G D V A V D S Y H L Y K E D I Q L L K N I G
181 GACATGATAAAAGGAGGAGGCAATGGAGACGTGGCTGTTGATTCATATCATTTGTACAAGGAAGATATACAGTTATTGAAGAACATAGGT
91 L D A Y R L S I S W S R V L P G G N L T G G V N K E G I D Y
271 TTAGATGCCTATCGTTTGTGCGATATCATGGTCAAGGGTACTTCCAGGTGGAACCTAACCGGTGGTGTCAACAAGGAAGGAATTGACTAC
121 Y N S L I D D L L A N G I Q P F V T L F H W D A P Q A L E D
361 TACAACAGCCTAATTGATGACCTACTCGCTAATGGTATCAACCGTTCGTTACTCTTCCATTGGGATGCTCCTCAAGCTTTAGAAGAT
151 E Y G G F L S P R I V D D F R Q Y V E L C F W E F G D R V K
451 GAATATGGCGGCTTCTTGAGTCCCTCGGATTGTTGATGATTTCCGCCAGTACGTAGAGCTATGTTTCTGGGAATTTGGTGATAGGGTAAAA
181 H W I T L N E P S T F S D A G Y A S G V Y A P G R G S T S P
541 CACTGGATTACGCTGAACGAACCGTCTACATTTAGTGTGCTGGATATGCTTCAGGGGTATATGCTCCCGGTGAGGGTCTACTTCCCCA
211 L L Q H R L R S A P S R T S P W G P H C K S S H G N P G T
631 GCTCTTTTACAACACCGTCTTCGCTCAGCCCAAGCCGAACCTTCTCCTTGGGGCCCTCATTGTAAAAGTAGCCACGGGAATCCTGGAAC
241 E P Y I V T H H L L L A H A T A V E L Y R N K F Q K S Q G G
721 GAGCCCTATATTGTGACTCACCATCTGCTTTTAGCCCATGCAACCGCGGTGCAATTGTACAGAAACAAGTTCCAGAAATCCCAAGGAGGA
271 S I G I T L I S Q W R E P L N D T E A D R K A A K R A L D F
811 AGTATTGGAATTACACTTATTTCTCAGTGGAGGGAGCCCTTAAATGATACTGAGGCAGATCGCAAGGCTGCGAAAAGAGCCTTAGATTTT
301 M F G W Y M P I T S G D Y P E S M K E L V G S R L P K F S
901 ATGTTTGGATGGTATATGGATCCCATACAGAGTGGTATTATCCAGAGAGCATGAAGGAATTAGTTGGATCGCGTCTTCCAAAATTTTCA
331 P E S K K L R G S Y D F L G L N Y Y T G T Y V T D A P K S
991 CCTGACGAATCAAGAAACTAAGAGGATCCTACGATTTTCTTGGATTGAATTACTACACTGGTACTTATGTGACTGATGCTCCTAAATCC
361 T G E M L S Y D T D A H V T Y T Y E R N G K L I G P K A A S
1081 ACTGGAGAAATGTTAAGCTATGACACGGATGCTCATGTACCTATACCTATGAACGTAATGGGAATTAATTGGTCCGAAGGCTGCTTCCG
391 D W L H M Y P E G M Y K L L I Y T K N T Y N V P L I Y I T E
1171 GATTGGCTGCATATGTATCCAGAAGGAATGTACAACTCCTAATTTACACAAAGAACACCTACAATGTTCTCTGATTTATATCACAGAA
421 N G V D E V N N T S L T L S E A R Q D T I R I K F I Q D H L
1261 AATGGGGTTGATGAAGTCAACAATACGAGTTTAACTTTCTGAAGCTCGCCAGGATACCATAGAAATTAATTTATTCAAGATCATCTT
451 Y N L L R A M K E G V N V K G Y F I W S L L D N F E W N E G
1351 TATAATCTTACGAGCAATGAAAGAAGGGGTGAATGTAAGGTTATTTTATATGGTCAATTGCTGGACAATTTGAATGGAATGAAGGC
481 Y T V R F G I V H V D Y N D N N A R Y P K D S A I W L F S S
1441 TACACTGTTCTGTTCCGGTATCGTCCATGTGGATTACAATGACAATAATGCAAGGTATCCAAAAGATTCAGCAATATGGCTCTTCACTTCT
511 F N K N M S T N V S F I K N G C V F I S T I F K Y V G T M L
1531 TTCAACAAGAACATGTCTACCAATGTGTCTTTTATCAAAAACGGATGTGTATTTATCAGTACCATTTTAAATATGTTGGACAATGTTG
541 L S K C I S A T E F S N *
1621 CTTAGCAATGTATATCTGCAACAGAATTTTCAAATTA

Слика П1. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца гена *CeBGLU1*. Обележене аминокиселине се разликују између ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2*.

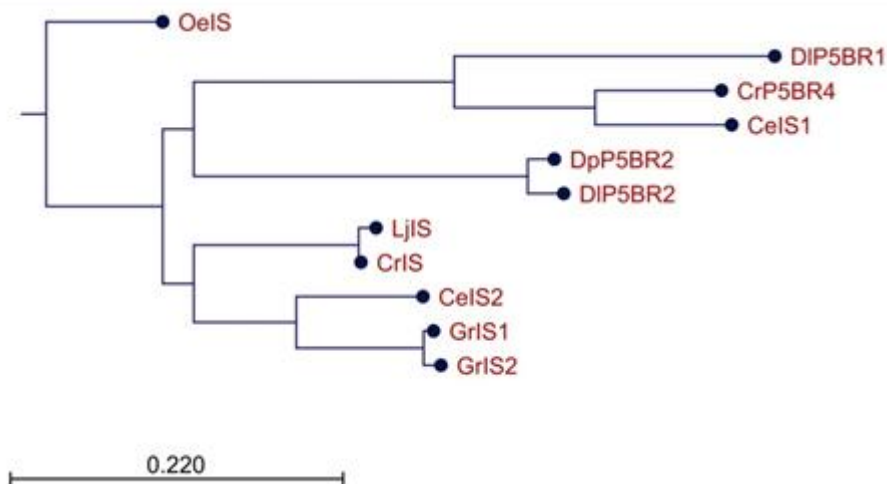
1 M A I L K R S G R I V P S G A S M I S R G D F P A D F V F G
1 ATGGCAATTCTGAAAAGAAGTGGCCGGATTGTGCCTAGTGGTGCATCTATGATCAGCCCGGTGATTTCCAGCTGATTTTGTATTTCGGA
31 S A T A A Y Q V E G G A R E G G R G P S I W D T F T H R R P
91 TCAGCGACTGCAGCTTACCAGGTGGAAGGAGGGGCGCGTGAGGGTGGCGTGGCCCGAGTATATGGGACACTTCCACCCATAGACGACCT
61 D M I K G G G N G D V A V D S Y H L Y K E D I Q L L K N I G
181 GACATGATAAAAGGAGGAGGCAATGGAGACGTGGCTGTTGATTCATATCATTTGTACAAGGAAGATATACAGTTATTGAAGAACATAGGT
91 L D A Y R L S I S W S R V L P G G N L T G G V N K E G I D Y
271 TTAGATGCCTATCGTTTGTGCGATATCATGGTCAAGGGTACTTCCAGGTGGAACCTAACCGGTGGTGTCAACAAGGAAGGAATTGACTAC
121 Y N S L I D D L L A N G I Q P F V T L F H W D A P Q A L E D
361 TACAACAGCCTAATTGATGACCTACTCGCTAATGGTATCAACCGTTCGTTACTCTTCCATTGGGATGCTCCTCAAGCTTTAGAAGAT
151 E Y G G F L S P R I V D D F R Q Y V E L C F W E F G D R V K
451 GAATATGGCGGCTTCTTGAGTCCCTCGGATTGTTGATGATTTCCGCCAGTACGTAGAGCTATGTTTCTGGGAATTTGGTGATAGGGTAAAA
181 H W I T L N E P S T F S D A G Y A S G V Y A P G R G S T S P
541 CACTGGATTACGCTGAACGAACCGTCTACATTTAGTGTGCTGGATATGCTTCAGGGGTATATGCTCCCGGTGAGGGTCTACTTCCCCA
211 L L Q H R L R S A P S R T S P W G P H C K S S H G N P G T
631 GATCTTTTACAACACCGTCTTCGCTCAGCCCAAGCCGAACCTTCTCCTTGGGGCCCTCATTGTAAAAGTAGCCACGGGAATCCTGGAAC

```

241 E_P_Y_I_V_T_H_H_L_L_L_A_H_A_T_A_V_E_L_Y_R_N_K_F_Q_K_S_Q_G_G
721 GAGCCCTATATGTGACTCACCATCTGCTTTTAGCTCATGCAACCGGGTCGAATTGTACAGAAACAAGTTCCAGAAATCCCAAGGAGGA
271 S_I_G_I_T_L_I_C_Q_W_R_E_P_L_N_D_T_E_A_D_R_K_A_A_K_R_A_L_D_F
811 AGTATTGGAATTACACTTATTTGTCAGTGGAGGGAGCCCTAAATGATACTGAGGCAGATCGCAAGGCTGCGAAAAGAGCCTTAGATTTT
301 M_F_G_W_Y_M_E_P_I_T_S_G_D_Y_P_E_S_M_K_E_L_V_G_S_R_L_P_K_F_S
901 ATGTTTGGATGTATATGGAGCCATAACAAGTGGTGATTATCCAGAGAGCATGAAGGAATTAGTTGGATCGCGTCTCCCAATTTTCA
331 P_E_S_K_K_L_R_G_S_Y_D_F_L_G_L_N_Y_Y_T_G_T_Y_V_T_D_A_P_K_S
991 CCTGAAGAATCAAAGAACTAAGAGGATCCTACGATTTTCTTGGATTGAATTACTACTGGTACTTATGTGACTGATGCTCCTAAATCC
361 T_G_E_M_L_S_Y_D_T_D_A_H_V_T_Y_T_Y_E_R_N_G_K_L_I_G_P_K_A_A_S
1081 ACTGGAGAAATGTTAAGCTATGACACGGATGTCATGTCACCTATACCTATGAACGTAATGGGAAATTAATTGGTCCGAGGCTGCTTCG
391 D_W_L_H_M_Y_P_E_G_M_Y_K_L_L_I_Y_T_K_N_T_Y_N_V_P_L_I_Y_I_T_E
1171 GATTGGCTGCATATGTATCCAGAAGGAATGTACAACTCCTAATTTACACAAGAACACCTACAATGTCCACTGATTATATCACAGAA
421 N_G_V_D_E_V_N_N_T_S_L_T_L_S_E_A_R_Q_D_T_I_R_I_K_F_I_Q_D_H_L
1261 AATGGCGTTGATGAAGTCAACAATACGAGTTTAACACTTTCTGAAGCTCGTCAGGATACCATTAGAATAAAATTTATTCAAGATCATCTT
451 Y_N_L_L_R_A_M_K_E_G_V_N_V_K_G_Y_F_I_W_S_L_L_D_N_F_E_W_N_E_G
1351 TATAATCTTCTACGAGCAATGAAAGAAGGGGTGAATGTAAGGTTATTTTATATGGTCATTGCTGGACAATTTTGAATGGAATGAAGGC
481 Y_T_V_R_F_G_I_V_H_V_D_Y_N_D_N_A_R_Y_P_K_D_S_A_I_W_L_F_S_S
1441 TACACTGTTTCGGTTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTC
511 F_N_K_N_M_S_T_N_V_S_F_I_K_N_G_C_V_F_I_S_T_I_F_K_Y_V_G_T_M_L
1531 TTCAACAAGAACATGTCTACCAATGTGTCTTTTATCAAAAACGGATGTGTATTATCAGTACCATTTTAAATATGTTGGGACAATGTG
541 L_S_K_C_I_S_A_T_E_F_S_N_*
1621 CTTAGCAAATGTATATCTGCAACAGAATTTTCAAATTA

```

Слика П2. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца гена *CeBGLU2*. Обележене аминокиселине се разликују између ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2*.



Слика П3. Филогенетска анализа аминокиселинских секвенци ензима *CeIS1* и *CeIS2* која показује њихову повезаност са осталим познатим иридоид синтазама и прогестерон-5- β -редуктазама. Филогенетско стабло је конструисано коришћењем *neighbor-joining* методе *CLC sequence viewer* 8.0 софтверског пакета. У Табели П3 прилога приказани су описи коришћених скраћеница за биљне врсте и приступни бројеви ензима у *on line* базама података.

Табела П1. Резултати факторијалне анализе варијансе (ANOVA) испитивања зависности између релативне експресије сваког од испитиваних гена ($\Delta\Delta Ct$ вредност) у листовима *C. erythraea* након механичке повреде као зависне променљиве и времена након повреде, стања листа (ПЛ или ЦЛ) и њихове међусобне интеракције као категоричких независних променљивих. У циљу стабилизације варијансе зависних променљивих пре ANOVA извршена је *Vox-Cox* трансформација. Статистички значајна разлика: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$

Ген	<i>Vox-Cox</i> трансформација	време	стање	време x стање
<i>CeGPPS</i>	<i>log</i>	***		
<i>CeGES</i>	<i>log</i>	***		
<i>CeG80</i>	<i>log</i>	***		
<i>Ce8HGO</i>	<i>sqrt</i>	***		
<i>CeIS2</i>	<i>log</i>	***		
<i>CeIO</i>		***		
<i>Ce7DLGT</i>	<i>sqrt</i>	***		
<i>Ce7DLH2</i>		***		
<i>CeSLS</i>	<i>sqrt</i>	***		
<i>CeCOII</i>	<i>sqrt</i>	***		
<i>CeJAZ1</i>		***	**	*
<i>CeMYC2</i>			*	
<i>CeBIS1</i>	<i>1/sqrt</i>	***		
<i>CeJAM2</i>		***		
<i>CeJAM3</i>		**		
<i>CeIS1</i>		**		

Табела П2. Протеинске секвенце коришћене за филогенетске анализе ензима *CeBGLU1* и *CeBGLU2* и њихови приступни бројеви

Скраћени назив	Биљна врста	Ензим	Приступни број
LlBGLU	<i>Laucaena leucocephala</i>	глукозилхидролаза 1	ABY48758.1
LjBGLU	<i>Lotus japonicus</i>	бета-глукозидаза D2	ACD65510.1
TrBGLU	<i>Trifolium repens</i>	цијаногена бета-глукозидаза	ABV54716.1
DcBGLU	<i>Dalbergia cochinchinensis</i>	далкохитин 8-О-бета-глукозидаза	AAF04007.1
GmBGLU	<i>Glycine max</i>	изофлавоин бета-глукозидаза	BAF34333.1
PsBGLU	<i>Prunus serotina</i>	амигдалин хидролаза	AAA93234.2
PsBGLU2	<i>Prunus serotina</i>	пруназин хидролаза	AAF34650.1
TcBGLU	<i>Theobroma cacao</i>	бета-глукозидаза 17	EOY32501.1
RhBGLU	<i>Rosa hybrid cultivar</i>	бета-глукозидаза	BAG13451.1
VvBGLU	<i>Vitis vinifera</i>	бета-глукозидаза 12	RVW48669.1
PaBGLU	<i>Populus alba</i>	бета-глукозидаза	TKR79480.1
CsBGLU	<i>Cheilocostus speciosus</i>	фуростанол глукозид 26-О-бета-глукозидаза	BAA11831.1
MnBGLU	<i>Morus notabilis</i>	бета-глукозидаза 12	EXB28969.1
CsBGLU	<i>Camellia sinensis</i>	бета-примевеозидназа	BAC78656.1

VfBGLU	<i>Viburnum furcatum</i>	фуркатин хидролаза	BAD14925.1
MeBGLU	<i>Manihot esculenta</i>	линамараза	AAB22162.1
VsnBGLU	<i>Vicia sativa subsp. nigra</i>	вицианин хидролаза	ABD03937.1
DIBGLU	<i>Digitalis lanata</i>	карденолид-16-О-глукохидролаза	CAB38854.2
OeBGLU	<i>Olea europea subsp. Europea</i>	бета-глукозидаза	AAL93619.1
RsBGLU1	<i>Rauvolfia serpentina</i>	стриктозидин-О-бета-D-глукозидаза	CAC83098.1
RvBGLU	<i>Rauvolfia verticillata</i>	стриктозидин-бета-D-глукозидаза	AFI71457.1
CrBGLU	<i>Catharanthus roseus</i>	стриктозидин бета-глукозидаза	AAF28800.1
RsBGLU2	<i>Rauvolfia serpentina</i>	рауцафрицин-О-бета-D-глукозидаза	AAF03675.1
RsBGLU	<i>Raphanus sativus</i>	мирозиназа	BAB17226.1
SaBGLU	<i>Sinapis alba</i>	тиоглукозид-глукохидролаза (мирозиназа)	CAA42534.1
CsBGLU	<i>Crocus sativus</i>	бета-глукозидаза 12	AQP26338.1
AsBGLU	<i>Avena sativa</i>	бета-D-глукозидаза	CAA55196.1
TaBGLU	<i>Triticum aestivum</i>	бета-глукозидаза	BAE92259.1
ZmBGLU1	<i>Zea mays</i>	прекурсор бета-D-глукозидаза	AAD03266.1
ZmBGLU2	<i>Zea mays</i>	бета-D-глукозидаза	AAB03266.1
ZmBGLU	<i>Zea mays</i>	бета-глукозидаза	CAA52293.1
McBGLU	<i>Macleaya cordata</i>	глукозидна хидролаза	OVA10570.1
PcBGLU	<i>Pinus contorta</i>	бета-глукозидаза	AAC69619.1
HvBGLU	<i>Hordeum vulgare</i>	бета-глукозидаза	AAA87339.1
AtBGLU	<i>Arabidopsis thaliana</i>	бета-глукозидаза	AAM61427.1
VuBGLU	<i>Vigna unguiculata</i>	бета-глукозидаза	QCD92277.1
CcBGLU	<i>Capsicum chinense</i>	бета-глукозидаза 43	PHU09711.1
SIBGLU	<i>Solanum lycopersicum</i>	бета-манозидаза	AAL37714.1
SsBGLU	<i>Salvia splendens</i>	бета-глукозидаза	TEY39922.1
LgBGLU	<i>Lamium galeobdolon</i>	бета-глукозидаза 3	AYK02733.1
SaBGLU	<i>Striga asiatica</i>	бета-глукозидаза	GER32887.1

Табела ПЗ. Протеинске секвенце коришћене за филогенетске анализе ензима *CeIS1* и *CeIS2* и њихови приступни бројеви

Скраћени назив	Биљна врста	Ензим	Приступни број
OeIS	<i>Olea europea</i>	иридоид синтаза	ALV83438.1
DIP5BR1	<i>Digitalis lanata</i>	прогестерон-5- β -редуктаза	ADL28122.1
CrP5BR4	<i>Catharantus roseus</i>	прогестерон-5- β -редуктаза 4	AIW09146.1
DpP5BR2	<i>Digitalis purpurea</i>	прогестерон-5- β -редуктаза	ACZ66261.1
DIP5BR2	<i>Digitalis lanata</i>	прогестерон-5- β -редуктаза	AIF73578.1
LjIS	<i>Lonicera japonica</i>	иридоид синтаза	AMB61048.1
CrIS	<i>Catharantus roseus</i>	иридоид синтаза	AFW98981.1
GrIS1	<i>Gentiana rigescens</i>	иридоид синтаза 1	AKI87774.1
GrIS2	<i>Gentiana rigescens</i>	иридоид синтаза 2	AKI87775.1

Биографија аутора

Јелена М. Божуновић (рођ. Бољевић) рођена је 22. децембра 1986. године у Београду. Основну и средњу школу завршила је у Београду. Биолошки факултет Универзитета у Београду уписала је школске 2005/2006. године, смер Биологија, а дипломирала је 2013. године. Докторске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2013/2014. године, студијски програм Биологија, модул Физиологија и молекуларна биологија биљака.

Од јула 2013. године ради као истраживач приправник Одељења за Физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду. У звање истраживач сарадник изабрана је септембра 2014. године. У периоду од јула 2013. године до краја 2019. године ангажована је на националном пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја републике Србије из програма основних истраживања под насловом „Физиолошка, хемијска и молекуларна анализа диверзитета ретких и угрожених биљних врста у циљу *ex situ* заштите и продукције биолошки активних једињења“ под бројем ОИ173024.

Јелена Божуновић је члан Друштва за физиологију биљака Србије и Европског друштва за биљну биологију (FESPB).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Божуновић

Број индекса Б3003/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Улога секоиридоидних глукозида и бета-глукозидазе у одбрамбеном одговору кичице (*Centaureum erythraea* Rafn) на стрес повређивањем“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Божуновић

Број индекса Б3003/2013

Студијски програм: биологија; физиологија и молекуларна биологија биљака

Наслов рада: „Улога секоиридоидних глукозида и бета-глукозидазе у одбрамбеном одговору кичице (*Centaureum erythraea* Rafn) на стрес повређивањем“

Ментори: др Сузана Живковић и др Анета Сабовљевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Улога секоиридоидних глукозида и бета-глукозидазе у одбрамбеном одговору кичице (*Centaureum erythraea* Rafn) на стрес повређивањем“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.