

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nina M. Devrnja

***IN VITRO* PROPAGACIJA I BIOLOŠKA  
AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I  
METANOLNIH EKSTRAKATA  
POVRATIČA (*Tanacetum vulgare* L.)**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nina M. Devrnja

***IN VITRO* PROPAGATION AND  
BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL  
OIL AND METHANOL EXTRACTS OF  
TANSY (*Tanacetum vulgare* L.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentori:

---

**Naučni savetnik dr Dušica Čalić**  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

---

**Vanredni profesor dr Tijana Cvetić Antić**  
Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

Članovi komisije:

---

**Viši naučni saradnik dr Jelena Savić**  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

---

**Vanredni profesor dr Dušica Janošević**  
Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

---

**Vanredni profesor dr Vele Tešević**  
Univerzitet u Beogradu  
Hemijski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu.*

*Srdačno se zahvaljujem svom mentoru dr Dušici Čalić na podršci, korisnim savetima i uloženom trudu tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Tijani Cvetić Antić na savetima, predusretljivosti i angažovanju na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu prilikom realizacije doktorske disertacije.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem dr Jeleni Savić za sveukupno angažovanje u realizaciji ove disertacije, za energiju, veliku želju i vreme koje mi je poklonila tokom izrade ove disertacije. Dugujem joj zahvalnost za angažovanje u realizaciji eksperimenata iz oblasti indukcije odbrambenih mehanizama. Posebno joj se zahvaljujem na prenesenom znanju, idejama, entuzijazmu i inspiraciji koji su vodili ka rešenju svakog problema. Retka je privilegija i bogatstvo raditi u takvom društvu.*

*Srdačno se zahvaljujem dr Dušici Janošević za saradnju na angažovanju u realizaciji histohemijskih eksperimenata.*

*Dr Veleto Teševiću dugujem zahvalnost za angažovanje u realizaciji eksperimenata izolacije etarskog ulja iz in vitro biljka i prezentovanju rezultata.*

*Svom šefu, dr Branki Vinterhalter, zahvaljujem se na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da učestvujem u istraživanjima u okviru projekta čiji je rukovodilac.*

*Prof. dr Siniši Raduloviću i dr Sandri Aranđelović sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije dugujem zahvalnost za angažovanje u realizaciji eksperimenata iz oblasti citotoksične aktivnosti. Zahvaljujem se dr Dijani Krstić-Milošević na angažovanju u realizaciji eksperimenata i pomoći u tumačenju rezultata iz oblasti antioksidativne aktivnosti i HPLC analiza. Dr Marini Soković dugujem zahvalnost za angažovanje u realizaciji eksperimenata antimikrobne aktivnosti. Zahvaljujem se kolegi Bobanu Anđelkoviću sa Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, za angažovanje u realizaciji eksperimenata iz oblasti HPLC-MS-TOF analiza. Iskrenu zahvalnost dugujem mr Mihailu Ristiću iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „dr Josif Pančić“ na realizaciji eksperimenata iz oblasti fitohemijskih GC-MS i GC-FID analiza. Dr Igoru Kostiću dugujem zahvalnost za saradnju i angažovanje u realizaciji eksperimenata u oblasti insekticidne aktivnosti. Zahvaljujem se Mirjani Perišić sa Instituta za fiziku na angažovanju u realizaciji eksperimenata i tumačenju rezultata PTR-MS analiza.*

*Dragim kolegamicama dr Jeleni Milojević i dr Tatjani Čosić iskreno se zahvaljujem na prijateljskoj podršci i pomoći koja nikad nije izostala.*

*Zahvaljujem se kolegama Dr Snežani Zdravković Korać i dr Aleksandru Cingelu na korisnim savetima i prijatnoj radnoj atmosferi. Svim kolegama i kolegamicama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka veliko hvala na kolegijalnosti i uvek zanimljivim radnim danima.*

*Mom sinu Marku i suprugu Nikoli hvala za ljubav i mir koji mi pružaju. Mojoj sestri i bratu, Dragani i Zoranu, neizmerno hvala što su bili moja podrška i zaleđe u svim danima koji su za nama.*

*Ovu disertaciju posvećujem mojim roditeljima, Jasminki i Milivoju, kao zahvalnost za bezuslovnu ljubav i slobodu koju su mi pružili.*

## ***In vitro* propagacija i biološka aktivnost etarskog ulja i metanolnih ekstrakata povratiča (*Tanacetum vulgare* L.)**

### REZIME

Rodu *Tanacetum* pripadaju mnoge aromatične, lekovite i ukrasne vrste bogate biološki aktivnim sekundarnim metabolitima. *Tanacetum vulgare* L. (syn. *Chrysanthemum vulgare* L., povratič, vratiželja, konopljika) je višegodišnja, zeljasta biljka, poreklom iz Evrope i centralne Azije koja se obično sreće duž puteva, pruga, pašnjaka i polja ali i priobalnih područja. U Srbiji je ova vrsta deo sinurbane (ruderalne) flore. Predmet istraživanja ove disertacije bila je fitohemijska karakterizacija sastava i bioloških aktivnosti etarskog ulja i metanolnih ekstrakata ove vrste.

*In vitro* kultura *T. vulgare* je uspešno uspostavljena iz semena biljaka sakupljenih u prirodi. Kultura izdanaka je uspešno održavana i multiplikovana na MS hranljivoj podlozi uz dodatak 6-benziaminopurina (BAP) a prilikom ožiljavanja BAP je zamenjen indolsirćetnom kiselinom (IBA). *In vitro* kultura korenova održavana je u tečnoj MS hranljivoj podlozi sa dodatkom IBA koja je uticala na povećanje biomase gajenih korenova tokom subkultura. Histoločkom analizom sekretornih struktura *in vitro* gajenih izdanaka utvrđeno je da su na listovima i stablu prisutne biserijadne glandularne trihome sa sekrecionim sadržajem u kojem su detektovani lipidi, terpeni i alkaloidi.

Hemijska analiza metanolnih ekstrakata herbe i korena *T. vulgare* ukazala je na to da su ekstrakti biljaka gajenih *in vitro* kvalitativno siromašniji u odnosu na metanolne ekstrakte biljaka iz prirode ali su se ekstrakti biljaka *in vitro* odlikovali višestruko većom zastupljenošću pojedinih jedinjenja, pre svih 3,5-*O*-dikafeoilhininskom kiselinom. Najzastupljenija jedinjenja su fenolne kiseline iz grupe derivata cimetine kiseline i to: neohlorogena, 3,5-*O*-dikafeoilhininska i dikafeoilhininska kiselina. Pored fenolnih kiselina detektovano je i 17 flavonoida. Relativni udeo fenolnih kiselina i flavonoida se razlikovao u zavisnosti od dela biljke korišćenog za pripremanje metanolnog ekstrakta.

Uporedna analiza fitohemijskog sastava isparljivih komponenti etarskog ulja *T. vulgare* sakupljenog sa prirodnog staništa i izdanaka gajenih *in vitro* pokazala je takođe velike razlike u zastupljenosti pojedinačnih ali i čitavih grupa jedinjenja. GC/MS analizom je pokazano da su kod biljaka iz prirode dominantne komponente u etarskom ulju pripadale grupi oksidovanih monoterpena, sa najzastupljenijim jedinjenjima *trans*-hrizantenil acetatom, *trans*-hrizantenolom, *trans*-tujonom i *cis*-tujonom. Sa druge strane, etarsko ulje *in vitro* gajenih biljaka *T. vulgare* karakterisalo se ujednačenim prisustvom monoterpena i seskviterpena. Svi monoterpeni identifikovani kod *in vitro* biljaka bili su prisutni i u etarskom ulju biljaka iz prirode dok su seskviterpenska jedinjenja bila daleko zastupljenija i raznovrsnija kod *in vitro* biljaka.

Za analizu bioloških aktivnosti jedinjenja sekundarnog metabolizma *T. vulgare* korišćeni su etarsko ulje i metanolni ekstrakti dobijeni iz biljaka sakupljenih iz prirode. Rezultati su pokazali da svi analizirani metanolni ekstrakti ispoljavaju značajnu antioksidativnu aktivnost koja je korelirala sa sadržajem ukupnih fenola u ekstraktima. Metanolni ekstrakt korena posedovao je najveći antioksidativni kapacitet a ujedno je sadržavao i najviše ukupnih fenola, sa najvećom relativnom zastupljenošću neohlorogene, 3,5-*O*-dikafeoilhininske i dikafeoilhininske kiseline u odnosu na ostale ekstrakte.

Etarsko ulje i metanolni ekstrakti cveta, lista, stabljike i korena *T. vulgare* ispoljili su i značajnu antimikrobnu aktivnost testiranu na 8 bakterijskih i 6 vrsta mikromiceta. Etarsko ulje *T. vulgare* ispoljilo je jako antimikrobno dejstvo prema većini ispitivanih bakterijskih (5 od analiziranih 8) i svim vrstama mikromiceta. S druge strane, metanolni ekstrakti korena, lista, cveta i stabljike *T. vulgare* ispoljili su jaku aktivnost na sve testirane vrste bakterija i većinu mikromiceta. U većini slučajeva efekti testiranih ekstrakata su bili na nivou efekata referentnih antibiotika i antimikotika korišćenih kao pozitivne kontrole, te se etarsko ulje i metanolni ekstrakti *T. vulgare* mogu preporučiti u prevenciji i lečenju infekcija izazvanih vrstama prema kojima je pokazana visoka aktivnost ali i kao agensi u konzerviranju i očuvanju kvaliteta namirnica u prehrambenoj industriji.

U daljem radu ispitivan je citotoksični potencijal etarskog ulja i metanolnih ekstrakata na maligne ćelijske linije humanog adenokarcinoma cerviksa (HeLa). Radi utvrđivanja nivoa

selektivnog efekta ispitivana je i aktivnost na zdrave humane ćelijske linije fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5). Rezultati *in vitro* testa su pokazali da je etarsko ulje ispoljilo najslabiju citotoksičnost dok su metanolni ekstrakti stabla i korena pokazali slabije citotoksično delovanje na ciljne ćelije u odnosu na metanolne ekstrakte lista i cveta. Nakon tretmana metanolnim ekstraktima lista i cveta kod većine HeLa ćelija došlo je do gubitka adhezije, skupljanja membrane i zaokrugljivanja ćelija što je ukazivalo na ćelijsku smrt.

Praćenje efekta etarskog ulja *T. vulgare* na larve gubara (*Lymantria dispar* L.) pokazalo je da etarsko ulje *T. vulgare* nije ispoljilo akutnu toksičnost na gusenice drugog stadijuma razvića ali je izazvalo odlaganje presvlačenja i značajno smanjenje procenta presvučenih gusenica. Ingestija etarskog ulja uticala je i na druge parametre rastenja i razvića posmatrane kod gusenica četvrtog stupnja razvića. Etarsko ulje je smanjilo dnevni prirast mase gusenica četvrtog stupnja kao i brzinu konzumacije hrane. Iako je etarsko ulje uticalo i na smanjenje konverzije svarene hrane u biomasu gusenica, to smanjenje se nije pokazalo kao statistički značajno pa se može zaključiti da je time smanjen negativni efekat ingestije etarskog ulja i delom kompenzovan smanjeni unos hrane izazvan prisustvom etarskog ulja.

U cilju ispitivanja potencijala etarskog ulja *T. vulgare* da indukuje mehanizme odbrane *in vitro* gajenih biljaka krompira koje su rasle u atmosferi ispunjenoj isparljivim komponentama ovog ulja, analizirana je ekspresija 4 gena uključena u mehanizme odbrane protiv patogena i herbivornih insekata. Prisustvo etarskog ulja izazvalo je intenzivnu indukciju dva analizirana PR (eng. *pathogenesis-related*) gena, *PR-2* i *PR-5*. Prve promene u ekspresiji uočene su nakon 8 sati od izlaganja, a maksimum ekspresije od oko 50 puta zabeležen je za *PR-2* gen nakon 12 h.

Na osnovu preliminarne PTR-MS analize i merenja zastupljenosti pojedinačnih jedinjenja etarskog ulja u atmosferi teglica u kojima je bio krompir dominantna jedinjenja su bila monoterpenski ugljovodonici  $\alpha$ -pinen i *p*-cimen. Pored ovih jedinjenja i artemizia-keton, *cis*-tujon, *trans*-tujon i kamfor su bili veoma zastupljeni, nagoveštavajući da bi možda upravo ove grupe jedinjenja mogli biti odgovorni za indukciju odbrane krompira.

**Ključne reči:** *Tanacetum vulgare* L., *in vitro* kultura, etarsko ulje, metanolni ekstrakti, antimikrobna aktivnost, citotoksična aktivnost, insekticidna aktivnost, indukcija odbrambenih mehanizama

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK brojevi:** [581.1:582.998.16]:57.084/57.085(043.3)



***In vitro* propagation and biological activity of essential oil and methanol extracts of tansy (*Tanacetum vulgare* L.)**

**ABSTRACT**

Many aromatic, medicinal and ornamental species rich in biologically active secondary metabolites belong to the genus *Tanacetum*. *Tanacetum vulgare* L. (syn. *Chrysanthemum vulgare* L., tansy) is a perennial, herbaceous plant originating in Europe and Central Asia, commonly encountered along roads, stripes, pastures, fields, and coastal areas. In Serbia, this species is part of the ruderal flora. The research subject of this dissertation was the phytochemical characterization of the composition and biological activities of *T. vulgare* essential oil and methanol extracts.

*In vitro* culture of *T. vulgare* was successfully established from seeds of plants harvested in nature. Shoot cultures have been successfully maintained and multiplied on the nutrient medium enriched with 6-benziaminopurine (BAP); for needs of rooting, BAP was replaced with indole buteric-acid (IBA). The root *in vitro* cultures were maintained in a liquid nutrient medium supplemented with IBA which influenced the increase in the biomass of cultivated roots during subcultures.

Histological analysis of secretory structures of *in vitro* plantlets showed presence of biseriate glandular trichomes with detected lipids, terpenes and alkaloids as secretory content,, both on the leaves and the stalk.

The chemical analysis of methanol extracts of *T. vulgare* herb and roots indicated that the extracts of *in vitro* cultivated plants were qualitatively poorer than methanol extracts of plants harvested in nature, but the extracts isolated from *in vitro* plants were characterized by several times higher presence of certain compounds, primarily 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid. The most common compounds were phenolic acids from the derivatives of cinnamic acid group, such as neohlorogenic, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic, and dicaffeoylquinic acid. In addition, 17 flavonoids were detected. The relative proportion of phenolic acids and flavanoids differed depending on the part of the plant used to prepare the methanol extract.

Comparative analysis of the chemical composition of the volatile components in essential oil of *T. vulgare* collected from the natural habitat and *in vitro* cultured plants has also shown great differences in the composition both of individual and entire groups of compounds. In the plants harvested in nature, GC/MS analysis showed that the dominant components belonged to the group of oxidized monoterpenes, with the most prevalent compounds of *trans*-chrysanthenyl acetate, *trans*-chryzanthenol, *trans*-thujone and *cis*-thujone. On the other hand, the essential oil obtained from *in vitro* grown *T. vulgare* plants was characterized by a uniform presence of monoterpenes and sesquiterpens. All monoterpenes identified in *in vitro* plantlets were also present in essential oil of plants collected from nature, on the other hand, sesquiterpene compounds were more diverse and more represent in *in vitro* plants.

Essential oil and methanol extracts isolated from plants harvested from natural habitat were used to analyze the biological activities of the *T. vulgare* secondary metabolism compounds. The results showed that all the analyzed methanol extracts exhibited a significant antioxidant activity that correlated with the total phenol content in the extracts. The root extract showed the highest antioxidant capacity, containing the highest amount of total phenols, with the maximum relative content of neochlorogenic, dicaffeoylquinic, and dicaffeoylquinic acids compared to other extracts.

The essential oil and methanol extracts of *T. vulgare* flowers, leaves, stalks and roots exhibited significant antimicrobial activity tested on 8 bacterial and 6 micromycetes species. *T. vulgare* essential oil exhibited a strong antimicrobial effect on most bacterial strains (5 of the 8 analyzed) and all strains of micromycetes. On the other hand, methanol extracts of *T. vulgare* roots, leaves, flowers and stalks exhibited strong activity on all tested bacterial species and most of the micromycetes. In most cases the effects of the tested extracts were at the level of the effects of the reference antibiotics and antimycotics used as positive controls, so both essential oil and methanol extracts of *T. vulgare* can be recommended in the prevention and treatment of infections caused by species on which high activity is shown and also as preserving agents in the food industry.

In further research, the cytotoxic potential of essential oil and methanol extracts on human cervical adenocarcinoma (HeLa) cells was investigated. To determine the level of selective effect, the activity on healthy human cell lines of fetal lung fibroblasts (MRC-5) was also studied. *In vitro* results showed that the essential oil exhibited the weakest cytotoxicity while methanol extracts of the stalk and root showed poor cytotoxic action on the target cells relative to the methanol extracts of leaf and flower. The most of HeLa cells exhibited loss of adhesion after leaf and flower methanol extracts treatment, also shrinking of membrane and rounding of cells were observed, indicating cell death.

Monitoring the effects of *T. vulgare* essential oil on gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larvae showed that this essential oil did not exhibit acute toxicity to the caterpillar of the second developmental stage, but caused a delay in the coating and a significant reduction in the percentage of coated caterpillars. Ingestion of essential oil influenced on the other parameters of growth and development observed in the fourth stage of caterpillar development. The essential oil reduced the daily increment of the mass of caterpillars of the fourth developmental stage as well as the rate of food consumption. Although the essential oil influenced the reduction in the conversion of digested food into the caterpillar biomass, this reduction did not appear to be statistically significant. Hence, it can be concluded that the negative effect of essential oil on ingestion was reduced and that reduced intake of food was partially compensated. In order to investigate the potential of *T. vulgare* essential oil to induce the mechanisms of defense of *in vitro* grown potato plants (grown in an atmosphere filled with volatile components of this oil), the expression of 4 genes involved in the mechanisms of defense against pathogens and herbivore insects was analyzed. The presence of essential oil induced intense induction of two analyzed PR (pathogenesis-related) genes, *PR-2* and *PR-5*. The first changes in expression were observed after 8 hours of exposure, and the maximum increase of expression of about 50 times was recorded for the *PR-2* gene after 12 h.

Based on the preliminary PTR-MS analysis and measurements of the representation of individual essential oil compounds in the atmosphere in jars where the potatoes were grown, the dominant compounds were the monoterpen hydrocarbons  $\alpha$ -pinene and *p*-

cymene. Beside these compounds, artemisia-ketone, *cis*-thujone, *trans*-thujone and camphor were highly represented, suggesting that these groups of compounds might be responsible for induction of potato defenses.

**Key words:** *Tanacetum vulgare* L., *in vitro* culture, essential oil, methanol extracts, antimicrobial activity, cytotoxic activity, insecticidal activity, induction of defense mechanisms

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant physiology

**UDC numbers:** [581.1:582.998.16]:57.084/57.085(043.3)

# SADRŽAJ

## SKRAĆENICE

<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	1
<b>1.1.</b>	<b>Sekundarni metaboliti biljaka</b>	1
1.1.1.	Mesta sinteze i akumulacije sekundarnih metabolita	2
1.1.2.	Hemijska priroda sekundarnih metabolita biljaka	4
1.1.2.1.	Fenolna jedinjenja	5
1.1.2.2.	Terpeni	9
1.1.3.	Etarska ulja	10
<b>1.2.</b>	<b>Biološke aktivnosti sekundarnih metabolita biljaka</b>	13
1.2.1.	Antioksidativna aktivnost	13
1.2.2.	Citotoksična aktivnost	19
1.2.3.	Antimikrobna aktivnost	22
1.2.4.	Insekticidna aktivnost	25
<b>1.3.</b>	<b>Uloga etarskih ulja u indukciji odbrambenih mehanizama susednih biljaka</b>	27
<b>1.4.</b>	<b>Taksonomski položaj, biološke i fitohemijske karakteristike vrste <i>Tanacetum vulgare</i> L.</b>	32
<b>2.</b>	<b>CILJEVI RADA</b>	37
<b>3.</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	38
<b>3.1.</b>	<b>Biljni material</b>	38
3.1.1.	Determinacija biljnog materijala	38

3.1.2.	Analiza polena	38
3.1.2.1.	Ispitivanje mikromorfologije polena	38
3.1.2.2.	Ispitivanje vijabilnosti polena <i>in vitro</i>	39
3.1.2.3.	Ispitivanje klijavosti polena <i>in vitro</i>	39
<b>3.2.</b>	<b>Gajenje biljaka u uslovima <i>in vitro</i></b>	<b>40</b>
3.2.1.	Uspostavljanje kulture <i>in vitro</i>	40
3.2.2.	Multiplikacija izdanaka <i>in vitro</i>	42
3.2.3.	Ožiljavanje izdanaka <i>in vitro</i>	42
3.2.4.	Uspostavljanje kulture korenova <i>in vitro</i>	42
<b>3.3.</b>	<b>Histološka i histohemijska analiza listova biljaka <i>T. vulgare</i> gajenih <i>in vitro</i></b>	<b>43</b>
3.3.1.	Priprema biljnog materijala za skenirajuću elektronsku mikroskopiju	43
3.3.2.	Priprema biljnog materijala za histološku analizu lista svetlosnom mikroskopijom	43
3.3.3.	Histohemijska analiza žlezdanih trihoma <i>T. vulgare</i>	44
<b>3.4.</b>	<b>Izolovanje i hemijska analiza etarskog ulja i metanolnih ekstrakata</b>	<b>46</b>
3.4.1.	Izolovanje etarskog ulja	46
3.4.2.	Analiza etarskog ulja gasnom hromatografijom sa plameno jonizacionim detektorom (GC/FID) i gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (GC/MS)	47
3.4.3.	Priprema metanolnih ekstrakata	48
3.4.4.	Analiza metanolnih ekstrakta tečnom hromatografijom direktno povezanom sa masenom spektrometrijom (LC/MS) i visokoefikasnom tečnom hromatografijom (HPLC)	49

<b>3.5. Određivanje sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnog potencijala metanolnih ekstrakata</b>	<b>50</b>
3.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima	51
3.5.2. Određivanje antioksidativnog potencijala metanolnih ekstrakata DPPH testom	51
3.5.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti testom redukujućeg potencijala	52
<b>3.6. Ispitivanje bioloških aktivnosti etarskog ulja i metanolih ekstrakata</b>	<b>53</b>
3.6.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja i metanolnih ekstrakata <i>T. vulgare</i>	53
3.6.1.1. Vrste mikroorganizama	54
3.6.1.2. Mikrodiluciona metoda	55
3.6.2. Ispitivanje citotoksične aktivnosti	56
3.6.2.1. Kulture ćelijskih linija	56
3.6.2.2. SRB test	57
3.6.2.3. Morfološka analiza citotoksičnog delovanja primenom svetlosne mikroskopije	58
3.6.3. Ispitivanje efekta etarskog ulja na gusenice gubara ( <i>Lymantria dispar L.</i> )	58
3.6.3.1. Gajenje larvi gubara u laboratorijskim uslovima	58
3.6.3.2. Ispitivanje rezidualne kontaktne toksičnosti etarskog ulja <i>T. vulgare</i> na gusenice gubara	60
3.6.3.3. Ispitivanje digestivne toksičnosti etarskog ulja <i>T. vulgare</i> na gusenice gubara drugog stupnja	61
3.6.3.4. Ispitivanje uticaja etarskog ulja <i>T. vulgare</i> na indekse rasta i ishrane gusenica gubara četvrtog stupnja	62

<b>3.7. Ispitivanje potencijala etarskog ulja <i>T. vulgare</i> za indukciju odbrambenih mehanizama krompira (<i>Solanum tuberosum</i>L.) <i>in vitro</i></b>	<b>63</b>
3.7.1. Priprema biljnog materijala	64
3.7.2. Analiza ekspresije gena koji učestvuju u odbrambenom odgovoru krompira	65
3.7.2.1. Izolacija ukupnih RNK	65
3.7.2.2. Reverzna transkripcija RNK molekula (RT)	67
3.7.2.3. Kvantitativna PCR reakcija (qPCR)	67
3.7.3. Detekcija isparljivih organskih jedinjenja uređajem PTR-MS	69
3.7.4. Analiza aktivnosti katalaza kod krompira tokom izlaganja etarskom ulju	70
3.7.4.1. Izolacija proteina	70
3.7.4.2. Denaturišuća elektroforeza (SDS-PAGE) i imunodetekcija proteina	70
3.7.4.3. Nativna elektroforeza (Native PAGE)	72
3.7.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti CAT	73
<b>3.8. Statistička analiza podataka</b>	<b>74</b>
<b>4. REZULTATI</b>	<b>75</b>
<b>4.1. Ispitivanje mikromorfologije polena</b>	<b>75</b>
<b>4.2. Ispitivanje vijabilnosti i klijavosti polena <i>in vitro</i></b>	<b>75</b>
<b>4.3. Gajenje biljaka <i>in vitro</i></b>	<b>78</b>
<b>4.4. Mikromorfološka i histološka analiza lista i karakterizacija sekundarnih metabolita biljaka gajenih <i>in vitro</i></b>	<b>84</b>
4.4.1. Mikromorfološka analiza lista <i>T. vulgare</i> binokularnom lupom i skenirajućom elektronskom mikroskopijom	84



4.4.2.	Histološka analiza lista svetlosnom mikroskopijom	86
4.4.3.	Histohemijska bojenja za dokazivanje sekundarnih metabolita	86
<b>4.5.</b>	<b>Hemijski sastav etarskog ulja i metanolnih ekstrakata</b>	<b>90</b>
4.5.1.	Identifikacija i kvantifikacija komponenti etarskog ulja	90
4.5.2.	Identifikacija i kvantifikacija komponenti metanolnih ekstrakata	99
4.5.3.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima	104
4.5.4.	Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH testom i testom redukujućeg potencijala	105
<b>4.6.</b>	<b>Ispitivanje antimikrobne aktivnosti</b>	<b>107</b>
<b>4.7.</b>	<b>Ispitivanje <i>in vitro</i> citotoksične aktivnosti</b>	<b>111</b>
<b>4.8.</b>	<b>Ispitivanje efekta etarskog ulja na gusenice gubara (<i>Lymantria dispar</i> L.)</b>	<b>115</b>
4.8.1.	Ispitivanje rezidualne kontaktne toksičnosti etarskog ulja <i>T. vulgare</i> na gusenice gubara	115
4.8.2.	Ispitivanje digestivne toksičnosti etarskog ulja na gusenice gubara drugog stupnja	117
4.8.3.	Ispitivanje uticaja etarskog ulja na indekse rasta i ishrane gusenica gubara četvrtog stupnja	119
<b>4.9.</b>	<b>Ispitivanje potencijala etarskog ulja <i>T. vulgare</i> za indukciju odbrambenih mehanizama krompira (<i>Solanum tuberosum</i> L.) <i>in vitro</i></b>	<b>121</b>
4.9.1.	Analiza ekspresije gena koji učestvuju u odbrambenom odgovoru krompira	121
4.9.2.	Detekcija isparljivih organskih jedinjenja uređajem PTR-MS	126
4.9.3.	Analiza aktivnosti katalaza kod krompira tokom izlaganja etarskom ulju	128

<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA</b>	130
<b>5.1.</b>	<b>Uspostavljanje <i>in vitro</i> kulture <i>T. vulgare</i>, karakterizacija sekretornih struktura i sekundarnih metabolita <i>in vitro</i> biljaka</b>	131
<b>5.2.</b>	<b>Hemijski sastav etarskog ulja i metanolnih ekstrakata</b>	139
<b>5.3.</b>	<b>Antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata</b>	144
<b>5.4.</b>	<b>Antimikrobna aktivnost etarskog ulja i metanolnih ekstrakata</b>	147
<b>5.5.</b>	<b>Citotoksična aktivnost etarskog ulja i metanolnih ekstrakata</b>	152
<b>5.6.</b>	<b>Efekat etarskog ulja <i>T. vulgare</i> na gusenice gubara (<i>Lymantria dispar</i> L.)</b>	157
<b>5.7.</b>	<b>Efekat etarskog ulja <i>T. vulgare</i> na indukciju odbrambenih mehanizama kod krompira gajenog <i>in vitro</i></b>	162
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	172
	<b>LITERATURA</b>	175
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	233
	<b>Prilog 1 – Izjava o autorstvu</b>	
	<b>Prilog 2 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije</b>	
	<b>Prilog 3 – Izjava o korišćenju</b>	

## SKRAĆENICE

AD	efikasnost asimilacije hrane (eng. <i>Approximate Digestibility</i> )
ANOVA	analiza varijanse
BAP	6-benzilaminopurin
BHA	butilhidroksianizola
BHT	butilhidroksitoluen
BM	bazalni medijum
BRR	biljni regulatori rasteња
<i>Bt</i> toksini	kristalni proteini izolovani iz bakterijskog soja <i>Bacillus thuringiensis</i>
CAT	katalaze
CDDP	cis-diamindihloroplatina(II), cisplatin
cDNK	komplementarni lanac dezoksiribonukleinske kiseline
CI	koncentracioni indeks
DCQA	di-kafeoilhininska kiselina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ECD	efikasnost konverzije svarene hrane (eng. <i>Efficiency of Conversion of Digested Food</i> )
ECI	efikasnost konverzije unete hrane (eng. <i>Efficiency of Conversion of Ingested Food</i> )
EU	etarsko ulje
FDA	fluorescein diacetat
GAE	galna kiselina
GC/FID	gasna hromatografija sa plameno jonizacionim detektorom
GC/MS	gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom
GLV	isparljiva jedinjenja koja se emituju sa listova (eng. <i>Green-Leaf Volatiles</i> )
HeLa	tumorske ćelije humanog grlića materice
HIPVs	isparljiva jedinjenja koje se emituju nakon napada herbivora (eng. <i>Herbivore-Induced Plant Volatiles</i> )
HPLC	tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
IBA	indol-3-buterna kiselina
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
JA	jasmonska kiselina (eng. <i>Jasmonic acid</i> )
LC	tečna hromatografija (eng. <i>Liquid Chromatography</i> )
LDL	lipoproteini niske gustine (eng. <i>Low Density Lipoprotein</i> )
LOX	lipoksigenaza
LSD	statistički test najmanje značajne razlike (eng. <i>Least Significant Test</i> )
MBK	minimalna baktericidna koncentracija

ME	metanolni ekstrakt
MFK	minimalna fungicidna koncentracija
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MRC-5	humane ćelije fetalnog plućnog fibroblasta
MS	hranjiva podloga po Murashige i Skoog (1962)
Native-PAGE	nativna elektroforeza na poliakrilamidnim gelovima
PR	geni uključeni u odbranu od patogena (eng. <i>Pathogenesis Related</i> )
PTR-MS	<i>Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry</i>
qPCR	kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja (eng. <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
RCR	relativna brzina konzumacije hrane (eng. <i>Relative Consumption Rate</i> )
RGR	relativna brzina rasta (eng. <i>Relative Growth Rate</i> )
ROS	reaktivne kiseonične vrste (eng. <i>Reactive Oxygen Species</i> )
RP	redukujući potencijal
RRT	relativno retenciono vreme
RT	reverzna transkripcija
SDS-PAGE	denaturišuća elektroforeza na poliakrilamidnim gelovima
SE	standardna greška
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina
VOC	isparljiva organska jedinjenja (eng. <i>Volatile Organic Compounds</i> )

## 1. UVOD

Nijedan organizam u prirodi ne postoji sam za sebe već ga definišu bliski kontakti sa drugim organizmima i sredina koja ga okružuje. Fundamentalni aspekt ovih interakcija je hemijske prirode tako da se u fitohemiji individue oslikava i njena biotička i abiotička sredina. Pri tome se biološke interakcije moraju sagledavati u svetlu evolutivnih promena, koevolucije ili koadaptacije organizama u prirodi. Tako će na primer biljka koja sintetiše jedinjenje koje remeti fiziološke funkcije herbivora imati selektivnu prednost u odnosu na one biljke koje ne sintetišu to jedinjenje.

### 1.1. Sekundarni metaboliti biljaka

Sekundarni metaboliti su dugo smatrani nepotrebnim “otpadom” i “greškama” primarnog metabolizma koji se u odsustvu ekskretornog mehanizma nakupljaju u biljkama (Mothes, 1966; Luckner, 1972, 1990). Postojala je i hipoteza da su ova jedinjenja nekada davno zapravo bila primarni metaboliti biljaka (Williams i sar., 1989) ali je ona odbačena u nedostatku relevantnih dokaza iako je danas poznato da mnogi sekundarni metaboliti mogu imati primarne funkcije što se objašnjava evolucionom pozadinom. Naposljetku su mnogi autori, naročito ekolozi, prihvatili hipotezu po kojoj sekundarni metaboliti povećavaju fitness individua i da su te individue favorizovane kroz proces prirodne selekcije (Rozenthal i Jansen, 1979; Harbone, 1986). Ogromna hemijska raznovrsnost sekundarnih metabolita danas je prepoznata kao esencijalni deo biljne strategije u borbi sa promenljivim uslovima često neprijateljske sredine. Molekularne, genetičke i analitičke metode doprinele su rasvetljavanju i razumevanju dinamične uloge sekundarnih metabolita biljaka. Svaka biljna populacija poseduje jedinstven set sekundarnih metabolita dobro prilagođenih na specifične zahteve ekološke niše (Hartmann, 2007). Iako je do danas proučeno samo oko 30% viših biljaka iz njih je izolovano stotine hiljada sekundarnih metabolita i njihova struktura je identifikovana nekom od analitičkih metoda sa masenom spektrometrijom (Wink, 2010). Danas je poznato da ova jedinjenja imaju ulogu u odbrani (protiv herbivora, mikroba, virusa, UV zračenja i kompetitora) kao i da su neka od njih signalni molekuli za oprašivače i vrste koje učestvuju u disperziji semena (Harborbne, 1993; Wink i Schimmer, 1999;

Wink, 1999, 2003). Važno je naglasiti da je često produkcija ovih jedinjenja vrlo niska (manje od 1% suve mase), da je sastav sekundarnih metabolita u biljci kompleksan, da može da se menja na tkivno i organ specifičan način, da promene mogu biti izražene tokom razvića (često organi koji su bitni za opstanak i reprodukciju imaju najveći nivo i najpotentnije sekundarne metabolite) te da mogu postojati razlike među individuama i populacijama (Oksman-Caldentey i Inze, 2001). Isparljivi sekundarni metaboliti su “jezik” kojima biljke komuniciraju sa sredinom koja ih okružuje. Ova jedinjenja se emituju u atmosferu sa površine listova, cvetova, plodova. Koren biljaka takođe oslobađa sekundarne metabolite u zemljište koji učestvuju u različitim interakcijama u rizosferi.

Struktura sekundarnih metabolita biljaka je oblikovana i optimizovana tokom evolucije što je omogućilo da mnoga jedinjenja poseduju bitne biološke i farmakološke osobine (Wink, 2010). Za biološku aktivnost mnogih biljnih preparata koji se koriste u tradicionalnoj medicini zaslužni su sekundarni metaboliti pa su se ova jedinjenja poslednjih 70 godina našla u fokusu farmaceutske, prehrambene, kozmetičke industrije i poljoprivrede. Nedavno istraživanje je ukazalo na podatak da u razvijenim zemljama, gde je hemija osnov farmaceutske industrije, 25% svih prepisanih lekova sadrže jedinjenja biljnog porekla (Oksman-Caldentey i Inze, 2004). Pored toga, 11% od 252 leka označena kao osnovna i esencijalna od strane Svetske zdravstvene organizacije (WHO, eng. *World Health Organisation*) potiču od cvetnica (Rates, 2001).

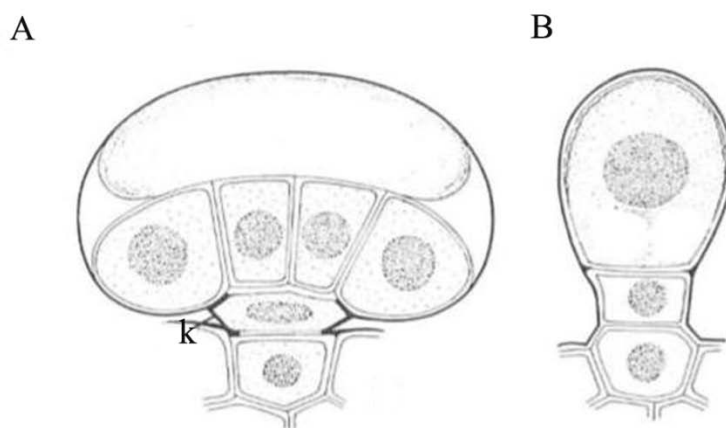
Nema sumnje da je hemijski diverzitet biljaka mnogo veći od bilo koje hemijske biblioteke koju je čovek napravio i zato carstvo biljaka predstavlja nepresušni izvor farmakoloških molekula koji tek treba da budu otkriveni.

### **1.1.1. Mesta sinteze i akumulacije sekundarnih metabolita**

Prema podacima iz literature postoji preko 300 različitih formi nežlezdanih (neglandularnih) i žlezdanih (glandularnih) trihoma. Dok neglandularne trihome imaju funkciju u sprečavanju pregrevanja biljke, rasejavanju semena i mehaničkoj odbrani od herbivora, glandularne trihome su mesta sinteze i akumulacije etarskih ulja i smola

(Werker, 2000). Pored ekološkog značaja, karakterizacija ovih struktura doprinosi taksonomskim studijama dok je poznavanje njihove morfologije od velikog značaja za sistematiku različitih taksonomskih nivoa.

Glandularne strukture su prisutne kod 30% vaskularnih biljaka uključujući familije *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Cannabinaceae* i druge (Fahn, 2000). To su visokospecijalizovane strukture koje nastaju od protodermske ćelije epidermisa koja je veća od ostalih ćelija epidermisa i karakteriše se brojnim organelama i gustom citoplazmom (Bosabadilis i Tsekos, 1982; Schnittger i Hulskamp, 2002). Deobom protodermske ćelije nastaje donja bazalna ćelija i ěnja ćelija. Asimetričnom deobom gornje ćelije formira se ćelija drške i gornja ćelija čijim će se deobama formirati brojne sekretornih ćelija glandularne trihome (Schnittger i Hulskamp, 2002). Glandularne trihome se mogu podeliti na one peltatnog i kapitatnog tipa (Slika 1.1). Peltatne trihome sadrže bazalnu ćeliju, jednu ili više kratkih ćelija drške i više sekretornih ćelija glave koje su okružene subkutikularnim prostorom u kome se akumuliraju produkti sekretornih ćelija (Turner i sar., 2000). Kapitatne trihome se sastoje iz bazalne ćelije, jedne ili više ćelija drške i jedne ili više sekretornih ćelija na vrhu drške (Maffei i sar., 2010). Ove trihome uglavnom proizvode neisparljiva ili slabo isparljiva jedinjenja koja se oslobađaju direktno na površinu trihome (Tissier, 2012a).



**Slika 1.1.** Struktura glandularnih trihoma: peltatna trihoma sa sekrecionim materijalom u subkutikularnom prostoru (A); kapitatna trihoma (B). k-kutikula. (Fahn, 1988)

Glandularne trihomi mogu biti uniserijatne i biserijatne u odnosu na to da li su ćelije organizovane u jednom ili više nizova. Ćelijski zid ćelija drške je najčešće prekriven kutikulom kako bi se sprečio kontakt sekrecionog materijala koji može biti autotoksičan za ostatak biljke (Fahn, 1988).

O molekularnim determinantima razvića glandularnih trihoma i dalje se malo zna (Wagner i sar., 2004). Kod *Arabidopsis thaliana* identifikovano je preko 40 gena koji učestvuju u regulaciji razvića trihoma (Schwab i sar., 2000). Interesantno je da razviće neglandularnih trihoma i korenskih dlaka kod *A. thaliana* uključuje slične gene i genske produkte (Kellogg, 2001).

U eksudatima trihoma najzastupljeniji su terpeni i fenolna jedinjenja dok alkoaloidi nisu česti (Wagner i sar., 2004). Terpeni (mono-, seskvi-, di- i triterpeni) su najčešća i strukturno najraznovrsnija grupa hemijskih jedinjenja identifikovanih u eksudatima glandularnih trihoma (Kelsey i sar., 1984). Pored terpena u eksudatima mogu da se nađu i aglikoni flavonoida s obzirom na to da su oni lipofilni i da mogu biti rastvorljivi u mešavini terpena dok se njihovi glikozidi uglavnom nalaze u vakuolama i hromoplastima (Wagner i sar., 2004).

Tip, distribucija kao i gustina trihoma variraju u zavisnosti od biljne vrste kao i od organa na kome se nalaze (Wagner, 2004) a mogu da se nađu kako na vegetativnim tako i na reproduktivnim organima (Fehn, 1988). Kod nekih vrsta biljaka, gustina trihoma na novim listovima raste nakon napada herbivora (Dalin i sar., 2008). Akumulacija sekundarnih metabolita u trihomama na površini biljke omogućava direktan kontakt sa insektima, patogenima i herbivorima te obezbeđuje prvu liniju odbrane a istovremeno daje vremena da biljka aktivira inducibilne odbrambene mehanizame.

### **1.1.2. Hemijska priroda sekundarnih metabolita biljaka**

Sekundarni metaboliti biljaka se po strukturi dele u tri velike grupe: fenolna jedinjenja, terpeni i alkaloidi.



### **1.1.2.1. Fenolna jedinjenja**

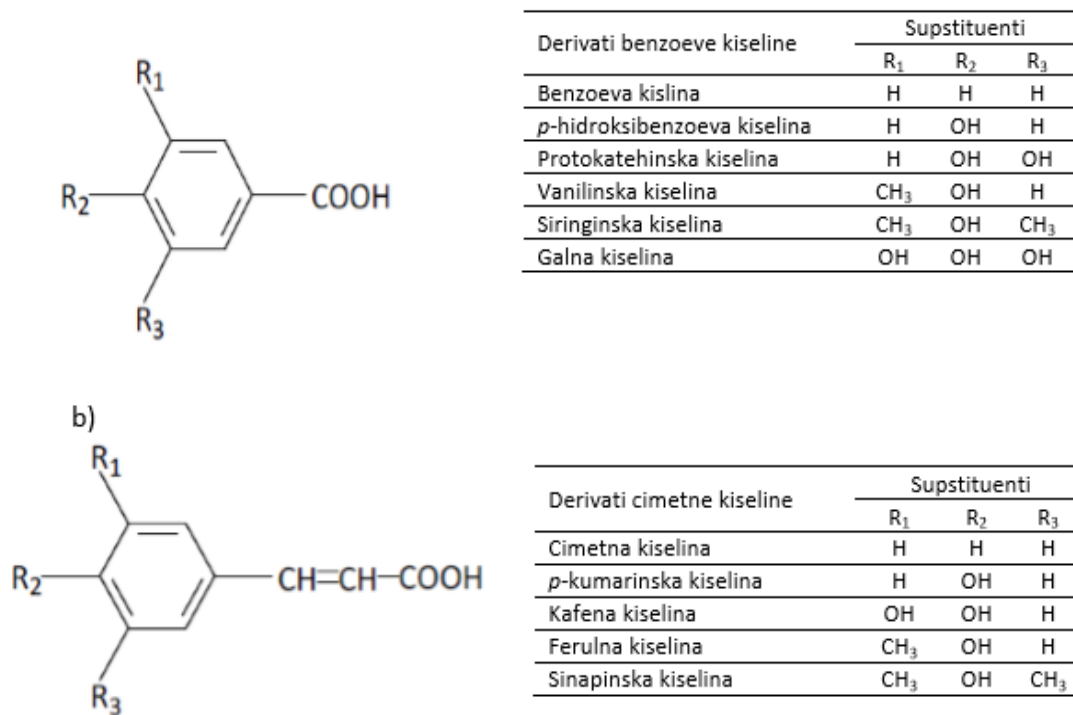
Fenolna jedinjenja su velika klasa sekundarnih metabolita široko rasprostranjenih u biljnom svetu. Smatra se da je diverzitet fenola veliki koliko i diverzitet biljnog carstva. Fenoli učestvuju u odbrani organizma od UV zračenja, patogena, parazita i predatora, odgovorni su za boju cvetova, plodova i organoleptična svojstva biljaka. Fenolna jedinjenja nisu samo učesnici odbrambenih mehanizama tokom biotičkog i abiotičkog stresa već učestvuju i u procesima koji doprinose normalnom rasteњу i razviću biljaka (Noel i sar., 2005; Taylor i Grotewold, 2005). Da bi uspešno obavljali svoje funkcije fenolna jedinjenja se akumuliraju u specifičnim tkivima ili ćelijama sa regulisanom subćelijskom lokalizacijom.

Postoji više od 8 000 fenolnih struktura i smatra se da je 40% organskog ugljenika u biosferi vazano u fenolnim jedinjenjima (Civjan, 2012). Veliki deo ovih jedinjenja su strukturne komponente ćelijskog zida ali mnogi fenoli imaju funkcije ključne za opstanak biljaka.

Biljni fenoli su aromatični molekuli koji poseduju jednu ili više hidroksilnih grupa (-OH) vezanih za najmanje jedan fenilski prsten (Stalikas, 2007; Dai i Mumper, 2010). Na osnovu broja ugljenikovih atoma fenolna jedinjenja biljaka mogu biti okarakterisana kao prosti fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, naftohinoni, ksantoni, stilbeni i lignini (Iwashina, 2000). Većina fenolnih jedinjenja nalazi se u formi rastvorljivih glikozida dok su aglikoni uglavnom slabo rastvoljivi. Fenolne kiseline i flavonoidi su najčešća fenolna jedinjenja kod biljaka koji se generalno javljaju kao rastvorljivi konjugati (glikozidi) ili kao nerastvorljive forme (Nardini i Ghiselli, 2004).

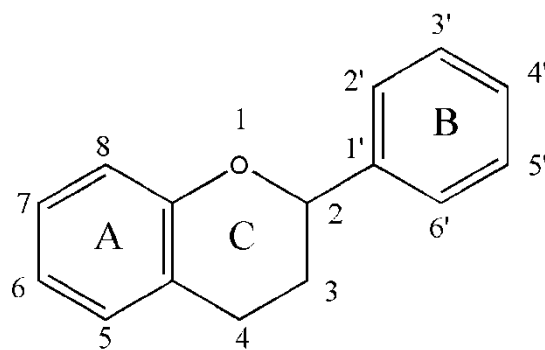
Fenolne kiseline (Slika 1.2.) sadrže najmanje jednu karboksilnu i jednu hidroksilnu grupu vezanu za fenolni prsten. Ove kiseline se dele na derivate benzoeve kiseline (C6-C1) i derivate cimetine kiseline (C6-C1) (Boros i sar., 2010). U hidroksibenzoeve kiseline spadaju galna, elaginska, protokatehinska, vanilinska, gentisinska i siringinska. Derivati cimetine kiseline su znatno zastupljeniji u prirodi od derivata benzoeve kiseline. U hidroksicimetine kiseline se ubrajaju kafeinska, ferulinska, sinapinska, parakumarinska, hlorogena i ruzmarinska. Ove kiseline su u biljkama često prisutne kao konjugati i retko se sreću u slobodnoj formi (Clifford, 2000). Kafeinska kiselina se često sreće esterifikovana sa

hininskom kiselinom kao kod hlorogene kiseline (Dai i Mumper, 2010). Fenolne kiseline nisu homogeno distribuirane u biljnim tkivima i varijabilnost u sadržaju ovih jedinjenja je izražena tokom različitih faza razvića (Sikorska i sar., 2000). Takođe, na sadržaj fenolnih kiselina u biljkama utiču i spoljašnji uslovi kao što je temperatura (Zheng i sar., 2001).



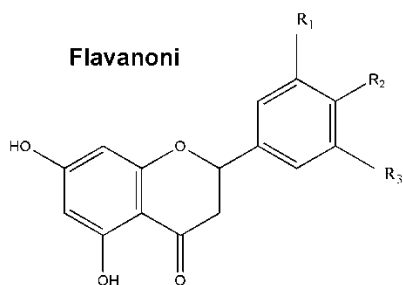
**Slika 1.2.** Struktura fenolnih kiselina.

Flavonoidi su druga velika grupa fenolnih jedinjenja prisutna u biljkama. Osnovnu strukturu ovih jedinjenja čini flavanski nukleus koji sadrži 15 ugljenikovih atoma raspoređenih u tri prstena (C6-C3-C6) označena kao A, B i C (Slika 1.3.) (Crozier i sar., 2006; Dai i Mumper, 2010).

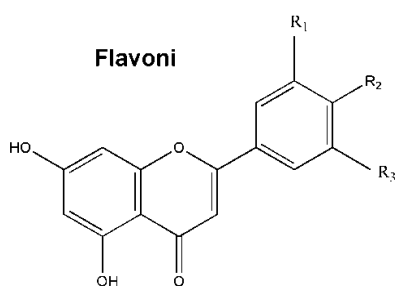


**Slika 1.3.** Osnovna struktura flavonoida.

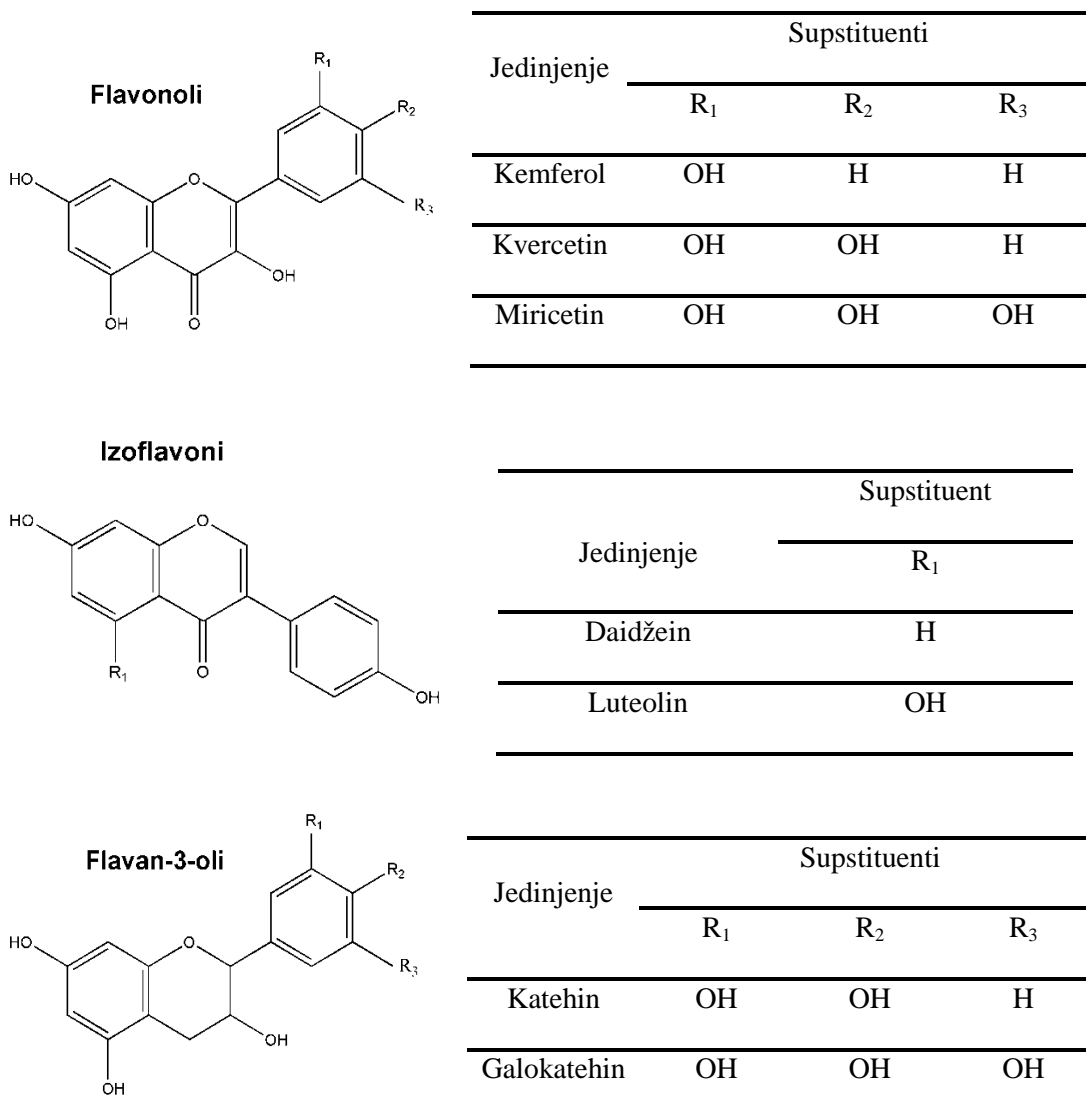
Flavonoidi se na osnovu oksidacionog stanja centralnog C prstena mogu podeliti u šest grupa: flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, flavanoni, izoflavoni i antocijanini (Slika 1.4.) (Cotelle, 2001; Dai i Mumper, 2010).



Jedinjenje	Supstituenti		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Naringenin	OH	H	H
Eriodiktiol	OH	OH	H
Hesperitin	OH	OH	OH



Jedinjenje	Supstituenti		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Apigenin	H	OH	H
Luteolin	OH	OH	H



**Slika 1.4.** Struktura različitih grupa flavonoida.

Flavonoidi su u biljnim tkivima često prisutni u obliku glikozida, sa jednom ili više šećernih grupa vezanih preko OH grupe (O-glikozidi) ili preko C-C veze (C-glikozidi). U flavonoide spadaju apigenin, luteolin, kvercetin, miricetin, katehin, epikatehin, genistein, hesperetin, naringenin, cianidin i još mnoga jedinjenja sa dokazanim biološkim aktivnostima.

### 1.1.2.2. Terpeni

Terpeni ili izoprenoidi su najveća grupa sekundarnih metabolita sa preko 40 000 identifikovanih jedinjenja (Aharoni i sar., 2005; Ashour i sar., 2010). Ova jedinjenja pokazuju ogromnu hemijsku i strukturnu raznovrsnost. Osnovna strukturna jedinica terpena je izopren koji sadrži 5 ugljenikovih atoma. Svi terpeni u zavisnosti od broja izoprenskih gradivnih blokova su klasifikovani kao monoterpeni ( $C_{10}$ ), seskviterpeni ( $C_{15}$ ), diterpeni ( $C_{20}$ ), sesterterpeni ( $C_{25}$ ), triterpeni ( $C_{30}$ ), tetraterpeni ( $C_{40}$ ) i politerpeni ( $C_{>40}$ ). U širem smislu u terpene se ubrajaju i hemiterpeni ( $C_5$ ) koji su prilično retki i steroidi ( $C_{27}$ ) koji nastaju iz triterpena ( $C_{30}$ ) oksidativnom dekarboksilacijom 3 metil grupe (Ashour i sar., 2010).

Terpeni su jedinjenja sa brojnim biološkim funkcijama. Ova jedinjenja su odgovorna za ukus i miris voća, povrća i cveća. Terpeni imaju industrijsku primenu i koriste se kao začini, arome i mirisna jedinjenja u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Pichersky i sar., 1994; Aharoni i sar., 2005). Pored toga, ova jedinjenja poseduju bitna farmakološka svojstva što im obezbeđuje brojne biološke aktivnosti kao što su antikancerogena, antimalarična, antimikrobna, antihipertenzivna, antihelmintična, antiinflamatorna, antimigrenozna i druge (Cantrell i sar., 2001; Abdin i sar., 2002; Wagner i sar., 2003; Rodriguez-Concepcion, 2004). Neki diterpeni i triterpeni imaju važnu ekološku ulogu i odgovorni su za povećanu otpornost biljaka na insekte (Powel i sar., 1997; Balkema-Boomstra i sar., 2003). Mnogi terpeni učestvuju u interakcijama među biljkama, između biljaka i mikroorganizama kao i između biljaka i herbivora (Arimura i sar., 2000; Dicke i Van Loon, 2000; DeMoraes i sar., 2001; Dicke i Bruin, 2001; Engelberth i sar., 2004). Isparljivi terpeni koji se karakterišu visokim naponom pare i ulaze u sastav etarskih ulja su uglavnom jedinjenja iz grupe monoterpena i seskviterpena. Postoje i isparljivi diterpeni ali su oni u etarskim uljima vrlo retki.

Monoterpeni su glavne mirisne komponente etarskih ulja i glavne komponente različitih smola koje učestvuju u odbrambenom odgovoru biljaka (Loza-Tavera, 1999; Bakkali i sar., 2008). Osnovnu strukturu monoterpena čine dve izoprenske jedinice ( $C_{10}$ ). Dele se na aciklične (izoprenske jedinice su povezane po sistemu glava-rep) i ciklične koju mogu biti

mono-, bi- i triciklični. Prema funkcionalnim grupama klasifikuju se kao aldehidi, ketoni, alkoholi, estri, etri i drugi (Bakkali i sar., 2008). Pored velike raznovrsnosti isparljivih jedinjenja, u monoterpena se ubrajaju i neisparljivi iridoidi i sekoiridoidi. Kod optički aktivnih monoterpena, u etarskim uljima se često sreću njihovi (+) i (-) enantiomeri koji ispoljavaju različit stepen biološke aktivnosti (Lis-Balchin i sar., 1999; Bakkali i sar., 2008). Monoterpeni ispoljavaju brojne biološke aktivnosti u zavisnosti od svoje strukture (Morse i Stoner, 1993; Bodake i sar., 2002; Lahlou i sar., 2003; Nakamura i sar., 2003; Allahverdiyev i sar., 2004).

Seskviterpeni su po zastupljenosti druga grupa terpena koja ulazi u sastav etarskih ulja. Izgrađeni su od tri izoprenska gradivna bloka (C<sub>15</sub>) i po strukturi mogu biti aciklični, monociklični i policiklični. Aciklični seskviterpeni se još nazivaju i farnezani jer nastaju od farnezola koji se nalazi u etarskom ulju pomorandže i mandarine (Civjan, 2012). Ogromna raznovrsnost cikličnih seskviterpena u odnosu na monoterpena je rezultat nekoliko modela ciklizacije koja je poboljšana usled dužeg lanca molekula. U monociklične seskviterpene ubrajaju se bisabolani, germakrani, humulani, elemeni i drugi tipovi monocikličnih seskviterpena. Biciklični seskviterpeni se klasifikuju kao eudezmani, gvajani, pseudogvajani, kariofileni, kadinani, drimani i drugi. Seskviterpenska jedinjenja su manje isparljiva u odnosu na monoterpena. Pored isparljivih jedinjenja u seskviterpena se ubrajaju i neisparljivi seskviterpanski  $\gamma$ -laktoni. Ova jedinjenja su izrazito farmakološki aktivna i mogu se klasifikovati u četiri velike grupe kao eudezmanolidi, germakrenolidi, gvajanolidi i pseudogvajanolidi (Pickman, 1986; Barrero i sar., 2000; Siedle i sar., 2004; Ghantous i sar., 2010).

### **1.1.3. Etarska ulja**

Etarska ulja su isparljive lipofilne smeše jedinjenja koja se karakterišu izrazitim mirisom a sreću se kod aromatičnih biljaka kao produkti sekundarnog metabolizma. U prirodi etarska ulja učestvuju u odbrani biljaka od mikroba, insekata i herbivora. Ove smeše služe i kao atraktanti insekata koji učestvuju u disperziji polena i semena ali i kao repelenti nepoželjnih insekata. Nazivaju se još i esencijalnim uljima prema reči koju je upotrebio švajcarski

reformator medicine Paracelsus von Hohenheim kada je efektivnu komponentu leka nazvao "*Quinta essentia*" (Guenther, 1948). Destilacija kao metoda za ekstrakciju etarskog ulja je korišćena pre više od 2 000 godina u Persiji, Indiji i Egiptu (Guenther, 1948). Metode hidrodestilacije i destilacije vodenom parom su kasnije usavršili arapski narodi tokom Srednjeg veka (Bauer i sar., 2001). Kasnije, etarska ulja sve više koriste i ekstrahuju farmaceuti i njihova farmakološka aktivnost biva opisana u farmakopejama (Bauer i sar., 2001). Saznanja o njihovom antiseptičnom dejstvu doprinela su da se etarska ulja koriste pri konzerviranju hrane, za balzamovanje, kao analgetici, sedativi, antiseptici i lokalni anestetici (Bakkali i sar., 2008).

Od oko 3 000 do sada ispitanih etarskih ulja, najčešće iz biljaka članova familija *Asteraceae*, *Alliaceae*, *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae* i *Poaceae*, njih oko 300 su industrijski značajna pre svega kao mirisi i arome (Van der Braak i Leijten, 1999). Međutim, njihove farmakološke osobine čine ih sve interesantnijim i za savremenu medicinu i sve je više saznanja o mehanizmima njihovog delovanja. Od ranije je poznato da etarska ulja poseduju antibakterijsku (Mourey i Canillac, 2002), antivirusnu (Bishop, 1995), antifungalnu (Mari i sar., 2003), antiparazitsku (Pessoa i sar., 2002) i insekticidnu aktivnost (Karpouhtsis i sar., 1998). Antibakterijske osobine etarskih ulja omogućile su njihovo korišćenje u stomatološkim preparatima (Manabe i sar., 1987) i kao antiseptika (Cox i sar., 2000). Komercijalno su dostupni i neki konzervansi koji sadrže etarska ulja kao što je "DMC Base Natural", konzervans koji je proizveden u Španiji a sadrži etarsko ulje ruzmarina, žalfije, i citrusa (Mendoza-Yepes i sar., 1997). Etarska ulja se nalaze u proizvodima za različite namene kao što je komercijalni supresant kljanja krtola krompira (Hartmans i sar., 1995) ili repelenti (Carson i Riley., 1993).

Etarsko ulje može da se sintetiše u svim delovima biljke, u cvetovima, listovima, stablu, korenu, pupoljcima, semenu, plodovima pa čak i kori. Akumulacija etarskog ulja odvija se u specijalizovanim unutrašnjim strukturama kao što su sekretorne ćelije, kaviteti i kanali ili u spoljašnjim strukturama kao što osmofore i glandularne trihome. Sastav etarskog ulja iz različitih delova iste biljke se može značajno razlikovati (Delaquis i sar., 2002). U sastav etarskog ulja ulaze jedinjenja koja hemijski pripadaju dvema velikim grupama metabolita,

terpenima i fenolnim jedinjenjima (Croteau i sar., 2000; Betts, 2001; Bowles, 2003; Pichersky i sar., 2006). Hemijski gledano, to su kompleksne smeše koje sadrže 20-60 jedinjenja zastupljenih u različitim koncentracijama. Obično su dve ili tri komponente zastupljene u visokoj koncentraciji (20-70%) u odnosu na ostale komponente koju su zastupljene u tragovima.

Veliki broj različitih konstituenata koji ulaze u sastav etarskih ulja doprinose da ove smeše nemaju specifično mesto delovanja u ćeliji (Carson i sar., 2002). Velika hemijska varijabilnost omogućava da etarska ulja ispoljavaju brojne biološke aktivnosti u zavisnosti od jedinjenja koja ulaze u njihov sastav. S obzirom na činjenicu da etarska ulja predstavljaju kompleksne mešavine različitih jedinjenja nameće se i pitanje da li je njihov biološki efekat rezultat sinergizma svih jedinjenja ili je to aktivnost samo glavnih jedinjenja koja su u ulju zastupljena sa visokim procentom. Uopšteno, glavne komponente u etarskim uljima uglavnom reflektuju biofizičke i biološke karakteristike etarskog ulja iz koga su izolovane i amplituda njihove aktivnosti zavisi od njihove koncentracije kada se ispituju samostalno ili u sastavu etarskog ulja (Ipek i sar., 2005). Ovako posmatrano, sinergizam svih konstituenata etarskog ulja se dovodi u pitanje. Ipak, neki autori naglašavaju značaj komponenti koje su u etarskom ulju zastupljene u tragovima ali koje menjaju aktivnost glavnih komponenti u ulju (Santana-Rios i sar., 2001; Hoet i sar., 2006). Najverovatnije je da nekoliko komponenti u etarskom ulju definišu njegov miris, teksturu, boju i što je posebno važno utiču na sposobnost penetracije u ćeliju te deluju na lipofilne i hidrofилne interakcije etarskog ulja i ćelijskog zida ili membrana (Cal, 2006). Posmatrano u svetlu biološke aktivnosti informativnije je ipak posmatrati kompleksnu smešu etarskog ulja nego njegovu izolovanu komponentu, tako da koncept sinergizma u ovom smislu ima više značaja.



## 1.2. Biološke aktivnosti sekundarnih metabolita biljaka

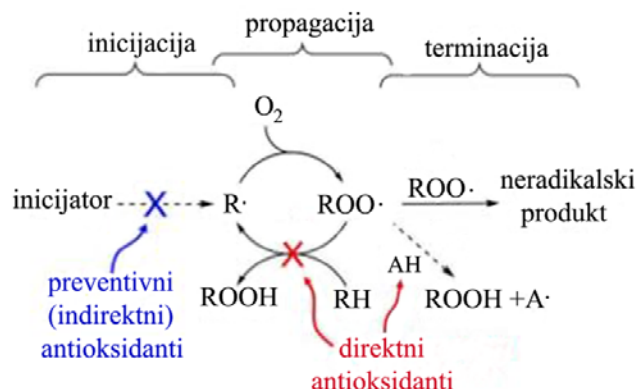
### 1.2.1. Antioksidativna aktivnost

Prilikom oksidativnog stresa dolazi do formiranja slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*). Slobodni radikali su atomi, joni i molekuli koji u svojoj strukturi imaju nesporen elektron što ih čini veoma reaktivnim (Gill i Tuteja, 2010). U reaktivne kiseonične vrste ubrajaju se radikali koji imaju nesporen elektron na atomu kiseonika i tu spadaju: superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), perhidroksil radikal ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ) i alkoksi radikal ( $RO^{\cdot}$ ). Akumulacija ROS u ćeliji vodi ka oksidativnom stresu koji uzrokuje oštećenja ćelijskih biomolekula uključujući proteine, nezasićene masne kiseline, amino kiseline i DNK (McCord, 2000). Kod ljudi ova oštećenja dovode do molekulskih promena povezanih sa starenjem, arteriosklerozom, karcinomom, dijabetesom, astmom, Alchajmerovom i Parkinsonovom bolešću (Edris, 2007).

Formiranje slobodnih radikala je rezultat različitih metaboličkih procesa u ćeliji. Međutim ćelijski redoks balans i neizmenjena struktura i funkcija održavaju se aktivnošću različitih antioksidativnih sistema u ćeliji kao i unosom antioksidanata kroz ishranu. Ovo naročito postaje značajno kada se redoks stanje poremeti usled delovanja oksidativnog stresa. Veliki broj fenolnih jedinjenja u *in vitro* testovima prevazilazi antioksidativno dejstvo dobro poznatih antioksidanta kao što su askorbat (vitamin C) ili  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), zahvaljujući sposobnosti da doniraju elektron ili atom vodonika (Hernandez i sar., 2009).

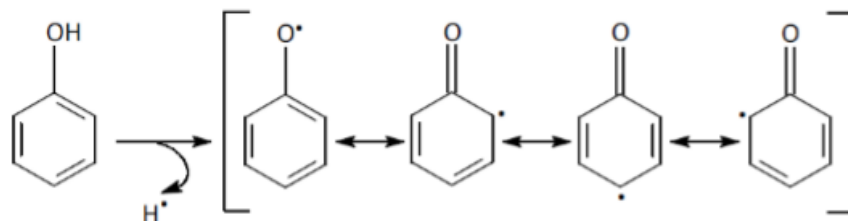
Antioksidanti se mogu okarakterisati kao jedinjenja sposobna da uspore ili spreče oksidaciju supstrata i kada se koriste u vrlo niskim koncentracijama ( $<1\%$ , najčešće 1-1000 mg/L) u poređenju sa koncentracijom supstrata (Amorati i sar., 2013). Oksidacija supstrata odnosno biomolekula u biološkim sistemima odvija se uz lančanu reakciju radikala posredovanu peroksil radikalom a paralelno sa autooksidacijom supstrata (Valgimigli i sar., 2012). Ovaj proces, prikazan i uopšten na Slici 5 počinje reakcijom slobodnog radikala (bez obzira na njegovo poreklo i strukturu) sa supstratom RH (lipid, protein, ugljeni hidrat i slično) čime nastaje alkil radikal  $R^{\cdot}$  koji sa kiseonikom ( $O_2$ ) formira peroksil radikal  $ROO^{\cdot}$ . Ciklično, peroksil radikal reaguje sa drugim molekulom supstrata RH i nastaje organski

peroksid ROOH (oksidovani supstrat) i novi radikal R• koji opet ulazi u lančanu reakciju oksidacije. Ovaj lančani sistem se ponavlja sve dok se nastali radikali ne stabilizuju delokalizacijom elektrona, formiranjem intramolekulskih vodoničnih veza ili reakcijom sa drugim radikalom (Valgimigli i sar., 2012).



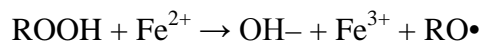
**Slika 1.5.** Uopšteni mehanizam autooksidacije ugljenih hidrata i antioksidativne zaštite. Predstavljena shema je modifikovana prema Valgimigli i sar., 2012.

Jedinjenja sposobna da prekinu lančanu reakciju oksidacije (smanjenjem lokalne koncentracije kiseonika, sprečavanjem formiranja peroksida, itd.) su tzv. direktni antioksidanti dok se jedinjenja koja sprečavaju nastajanje slobodnog radikala nazivaju preventivni antioksidanti (Slika 1.5; Valgimigli i sar., 2012). Direktni antioksidanti su jedinjenja koja mnogo brže reaguju sa peroksil radikalom od oksidirajućeg supstrata i tako sprečavaju formiranje organskog peroksida i prekidaju lančanu reakciju u fazi propagacije. Donirajući vodonik ili elektron slobodnim radikalnim grupama direktni antioksidanti ih transformišu u stabilnije produkte (Slika 1.6.).



**Slika 1.6.** Prelaz vodonikovog atoma sa antioksidansa na fenoksil radikal i formiranje stabilnog fenoksi radikala stabilizovanog rezonancom.

Preventivni antioksidanti sprečavaju razlaganje lipidnih hidroperoksida na slobodne radikale a takođe smanjuju i brzinu inicijacije lančane reakcije tako što inaktiviraju metale, uklanjaju kiseonik ili vezivuju proteine koji ispoljavaju prooksidativnu aktivnost. Preventivni antioksidanti su limunska kiselina, askorbinska kiselina i druga jedinjenja koja su helatori jona prelaznih metala i sprečavaju Fentonovu reakciju koja je jedna od najvažnijih reakcija formiranja slobodnog radikala.



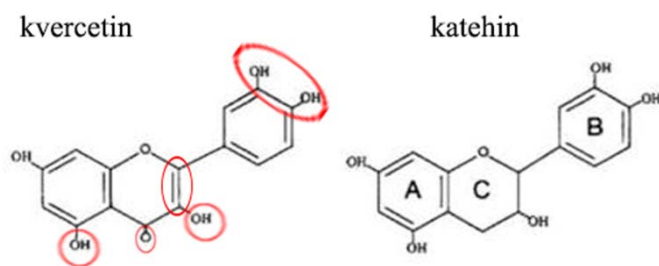
Pored toga, preventivni antioksidanti su potpuno neefikasni ukoliko započne lančana reakcija oksidacije te su direktni antioksidanti najznačajniji za prekidanje tog cikličnog procesa. Činjenica da neko jedinjenje može da reaguje sa kiseoničnim vrstama ne čini ga antioksidantom osim ukoliko: (i) to jedinjenje ne reaguje sa peroksil radikalom, (ii) reakcija je brža nego reakcija peroksil radikala i supstrata i (iii) produkt reakcije sprečava nastavak lančane reakcije oksidacije (Valgimigli i sar., 2012).

Kao što je već pomenuto, mnoge studije su do sada ukazale na različite biološke aktivnosti sekundarnih metabolita fenolne prirode uključujući antivirusnu, antialergenu, antiinflamatornu, vazodilatatornu, antioksidativnu i antikancerogenu (Dinis i sar., 1994; Middleton i sar., 2000; Narayana i sar., 2001; Havsteen, 2002; Lattanzio i sar., 2008; Dai i Mumper, 2010). Međutim, najveća pažnja posvećena je njihovoj antioksidativnoj aktivnosti koju ispoljavaju zahvaljujući sposobnosti da budu donori elektrona ili H atoma i tako neutrališu slobodne radikale.

Fenolna jedinjenja mogu da heliraju jone prelaznih metala koji imaju prooksidativno dejstvo ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ) i da inhibiraju prooksidativne enzime ali je ipak najizraženija njihova funkcija hvatača slobodnih radikala. Fenolna jedinjenja su prototip antioksidanata koji dovode do prekidanja lančane reakcije oksidacije jer hidroksilna grupa vezana za fenolni prsten deluje kao donor vodonika i elektrona slobodnom radikalumu a pored toga sistem konjugovanih dvogubih veza aromatičnog prstena delokalizuje nespareni elektron (Cotelle, 2001). Razlike u strukturi i tipu supstitucije utiču na stabilnost fenoksil radikala pa tako i na antioksidativnu sposobnost fenolnih jedinjenja.

Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina zavisi od broja i pozicije hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilne grupe (Balasundram i sar., 2006). Veći broj hidroksilnih i metoksilnih grupa na fenolnom prstenu (kao npr. kod kafeinske kiseline) povećava antioksidativnu aktivnost što doprinosi tome da derivati cimetine kiseline ispoljavaju veću antioksidativnu aktivnost od derivata benzoeeve kiseline (Rice-Evans i sar., 1996). S druge strane, antioksidativna aktivnost flavonoida zavisi od prirode supstituenata vezanih za prstenove, naročito B prstena (Rice-Evans i sar., 1997; Seyoum i sar., 2006; Wojdyło i sar., 2007). Strukturni aranžmani flavonoida koji pojačavaju njihovo antioksidativno dejstvo su: (i) *o*-dihidroksi struktura B prstena koja doprinosi stabilnosti novonastalog radikala i omogućava delokalizaciju elektrona, (ii) 2,3-dvoguba veza u konjugaciji sa 4-oksi funkcionalnom grupom na C prstenu je odgovorna za delokalizaciju elektrona B prstena i (iii) 3- i 5-OH grupa sa 4-oksi funkcionalnom grupom na A i C prstenu koje doprinose maksimalnom antioksidativnom dejstvu (Rice-Evans i sar., 1996).

Takođe je uočeno da je 3-OH grupa neophodna za antioksidativnu aktivnost i da 3-glikozilacija redukuje antioksidativnu sposobnost u poređenju sa aglikonom (Dai i Mumper, 2010). Sve ove strukturne prednosti koje doprinose većoj antioksidativnoj aktivnosti mogu da se uoče na primeru kvercetina (Slika 1.7.).



**Slika 1.7.** Struktura kvercetina i katehina sa istaknutim aranžmanima koji pojačavaju antioksidativno dejstvo.

Opsežna istraživanja su dokazala antioksidativno dejstvo fenolnih jedinjenja u mnogim biohemijskim i *ex vivo* sistemima kao što su izolovani lipoproteini niske gustine (LDL, eng. *Low Density Lipoprotein*), sintetičke membrane, *ex vivo* humana plazma (Fraga, 2007).

Dokazane su i mnoge sinergističke aktivnosti među različitim fenolima ili između fenola i nefenolnih antioksidanata (Vinson i sar., 2001).

Treba napomenuti da neka fenolna jedinjenja mogu da iniciraju autooksidaciju supstrata i da u određenim uslovima ispolje prooksidativnu aktivnost (Cotelle, 2001). Umesto prekida lančane reakcije oksidacije, fenoksil radikal može da reaguje sa kiseonikom i da formira hinon ( $P=O$ ) ili superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ). Uslovi pri kojima se ispoljava prooksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja su uslovi koji favorizuju autooksidaciju ovih jedinjenja a to su povećani pH sa visokom koncentracijom kiseonika ili jona prelaznih metala. Pritom treba naglasiti da manja fenolna jedinjenja koja se lako oksiduju ispoljavaju prooksidativnu aktivnost za razliku od jedinjenja veće molekulske mase koja ispoljavaju slabu ili nikakvu aktivnost kao prooksidanti (Hagerman i sar., 1998).

Zbog izrazite hemijske raznovrsnosti i složenosti u sastavu fenolnih jedinjenja u biljkama, identifikacija i procena antioksidativne aktivnosti svakog pojedinačnog jedinjenja je skup i neefikasan proces. Pored toga, antioksidativna aktivnost ukupnog fenolnog kompleksa u biljkama je često važniji i informativniji podatak kada se govori o njihovom uticaju na zdravlje ljudi. Zato se često koriste skrining metode za brzu kvantifikaciju antioksidativne aktivnosti biljnog uzorka koji sadrži fenolna jedinjenja.

Antioksidativne osobine etarskih ulja predstavljaju ključni karakter koji im omogućuje ispoljavanje i drugih bioloških efekata, što se objašnjava time da mnoga patološka stanja uključuju oksidativni stres (Valgimigli i sar., 2012). Pokazano je da sekundarni metaboliti koji ulaze u sastav etarskih ulja poseduju antioksidativnu aktivnost (Ferguson i Philpott, 2008; Miguel, 2010). Ove osobine pripisuju se pre svega fenolnim jedinjenjima u etarskim uljima premda najčešće korišćene destilacione metode izolacije etarskog ulja ograničavaju sadržaj fenola u ulju jer je većina fenolnih jedinjenja neisparljiva. U poređenju sa terpenima, fenolna jedinjenja iz etarskih ulja ispoljavaju jaču antioksidativnu aktivnost (Pietta, 2000) pri čemu se posebno ističe antioksidativna aktivnost karvakrola i timola (Tepe i sar., 2006; Miguel, 2010). Većina terpenskih jedinjenja iz etarskog ulja može da reaguje sa peroksil radikalom pri čemu reakcija vodi ka formiranju reaktivnog alkil radikala koji u prisustvu kiseonika formira peroksil radikal koji nastavlja lančanu reakciju

oksidacije. Drugim rečima, terpeni se u ovoj reakciji autooksiduju kao i sam supstrat (Amorati i sar., 2013). Međutim i mnoga etarska ulja koja ne sadrže fenolne komponente pokazuju antioksidativni efekat pre svega zahvaljujući cikloheksadienskoj strukturi nekih terpenskih jedinjenja kao što su  $\alpha$ -terpinen i  $\gamma$ -terpinen (Amorati i sar., 2013). Terpeni koji poseduju ovakvu strukturu uzrokovace smanjenje intenziteta oksidacije supstrata ali neće sprečiti lančanu reakciju oksidacije. S druge strane, neki autori ukazuju i na međusobni antagonizam fenolnih i terpenskih komponenti etarskih ulja (Perry i sar., 2003; Azzai sar., 2011).

Rezultati ispitivanja antioksidativnog dejstva etarskih ulja tri vrste majčine dušice, koja u svom sastavu nisu imale fenolne komponente već su se odlikovala visokom koncentracijom 1,8-cineola i linaloola, pokazali su dejstvo slično  $\alpha$ -tokoferolu (Miguel i sar, 2004). Etarsko ulje majčine dušice ispoljilo je veoma jaku antioksidativnu aktivnost od ispitivanih 25 etarskih ulja različitih biljaka a za njim su sledila ulja karanfilića, cimeta, bosiljka, eukaliptusa i kamilice (Wei i Shibamoto, 2010). Etarsko ulje čajevca čija antioksidativna svojstva se pripisuju terpinenu i terpinolu, preporučeno je kao alternativa sintetičkom antioksidantu butilhidroksitoluenu, BHT (Kim i sar., 2004).

Generalno, analizom sastava etarskog ulja se može predvideti njegova antioksidativna sposobnost. Jaka antioksidativna sposobnost se očekuje kod etarskih ulja koja imaju visok sadržaj fenolnih jedinjenja a umereno terpena dok se još jača aktivnost očekuje kod ulja sa visokim sadržajem fenola i terpena cikloheksadienske strukture. Kod etarska ulja koja ne sadrže ili sadrže male količine fenola i cikloheksadienskih terpena očekuje se niska antioksidativna aktivnost (Amorati i sar., 2013).

Upotreba etarskih ulja kao prirodnih antioksidanata je u porastu što je od posebnog značaja s obzirom da neka istraživanja ukazuju na štetnost po zdravlje široko korišćenih sintetičkih antioksidanata butilhidroksanizola (BHA) i butilhidroksitoluena (BHT) (Lanigan i Yamarik, 2002).

### 1.2.2. Citotoksična aktivnost

Različiti oblici karcinoma predstavljaju rastući zdravstveni problem širom sveta i po brojnosti drugi uzročnik smrti odmah posle srčanih oboljenja (Reddy i sar., 2003). Prema informacijama Međunarodne agencije za istraživanje karcinoma (IARC, eng. *International Agency for Research of Cancer*), svake godine se u svetu zabeleži 10 miliona novih slučajeva oboljevanja (<https://goo.gl/0z12g3>) a do 2020. godine očekuje se oko 40 000 novih slučajeva karcinoma u Srbiji (<https://goo.gl/I9kDbJ>). Različiti su fizički i biohemijski kancerogeni, uključujući UV i jonizujuće zračenje, duvanski dim, bakterijske i virusne infekcije, parazite, patogene hrane i mikotoksine. Neke vrste karcinoma nastaju i kao posledica hiperprodukcije slobodno radikalskih formi koje uzrokuju oksidativna oštećenja biomolekula mehanizmima o kojima je već bilo reči.

Danas se na tržištu nalazi veliki broj medikamenata koji se sa različitom efikasnošću koriste u lečenju različitih vrsta karcinoma ali retko koji od njih se može smatrati zadovoljavajućim rešenjem ne samo zbog niske efikasnosti u zaustavljanju proliferacije ćelija kancera, već pre svega zbog visoke citotoksičnosti i veoma negativnih efekata koje ispoljavaju istovremeno na zdrave ćelije. Decenijama unazad kao alternativa hemijskim sintetičkim medikamentima predlaže se korišćenje prirodnih jedinjenja izolovanih iz različitih biljnih vrsta u prevenciji i terapiji karcinoma. Brojna istraživanja su se bavila ispitivanjem onkoprotektivne uloge jedinjenja biljnog porekla (Kampa i sar., 2003; Chinou, 2005). U fokusu mnogih istraživanja je otkrivanje mehanizama citotoksičnog dejstva sekundarnih metabolita prisutnih u voću, povrću, čaju i vinu na različite tipove tumorskih ćelija (Le Marchand 2002; Arts 2008, Kale i sar., 2008; Serafini i sar., 2012).

Pokazano je da biljni ekstrakti koji sadrže fenolna jedinjenja ili sami izolovani fenoli imaju potencijal da inhibiraju rast različitih tumorskih ćelija u zavisnosti od primenjene koncentracije i osetljivosti ćelijskih linija u *in vitro* testovima (Kuntz i sar., 1999; Damianaki i sar., 2000; Seeram i sar., 2006; Zhang i sar., 2008). Sprovedene su čak i mnoge *in vivo* studije koje su ukazale na citotoksičan efekat i antitumorski potencijal fenolnih jedinjenja (Ding i sar., 2006; Lala i sar., 2006).

Inhibitorni efekat na kancerogenezu fenolna jedinjenja ostvaruju preko dva osnovna mehanizma: modifikacijom redoks statusa i antiproliferativno, delujući na osnovne ćelijske funkcije tumorskih ćelija koje su u vezi sa procesom kancerogeneze a koja podrazumevaju ćelijski ciklus i apoptozu (Kampa i sar., 2007). Zahvaljujući svojoj izuzetnoj antioksidativnoj aktivnosti fenolna jedinjenja kontrolišu redoks status čiji disbalans dovodi do geneze oksidativnog stresa koji je jedan od glavnih faktora indukcije kancerogeneze. Rezveratrol, kvercetin, rutin, kafeinska kiselina, hlorogena kiselina, epikatehin, različiti antocijanini i drugi polifenoli dokazano smanjuju nivo ROS u ćeliji kao i posledice oksidativnog stresa kod različitih humanih tumorskih ćelija (Burkhardt i sar., 2001; Alia i sar., 2006; Schaefer i sar., 2006). S druge strane, fenolna jedinjenja poput kvercetina, rutina, apigenina i fenolne kiseline poput galne ili kafeinske u *in vitro* studijama su imala potencijal da utiču na razvoj karcinoma u različitim fazama. U fazi promocije tumora, fenolna jedinjenja mogu da spreče proliferaciju izazivajući oksidativna oštećenja na DNK lancu tumorskih ćelija (Elbling i sar., 2005; Azmi i sar., 2006), zaustavljajući ćelijski ciklus u nekoj od faza (Fresco i sar., 2006; Ramos i sar., 2008) ili uzrokuju inhibiciju rastanja tumorskih ćelija indukcijom apoptoze (Ramos, 2007). Tumorske ćelije se inače odlikuju prekomernom proliferacijom, produženim životnim ciklusom i nemogućnošću završetka diferencijacije i započinjanja apoptoze koja ima važnu ulogu u eliminaciji tumorskih ćelija. Kod ćelija koje uđu u apoptozu dolazi do kondenzacije hromatina i fragmentacije DNK, te ove ćelije bivaju prepoznate od strane makrofaga pre same lize ćelija i uklanjaju se pre nego započne upalni proces ili inflamacija, koji takođe predstavlja važan aspekt kancerogeneze. Naime, poznato je da prostaglandini koji posreduju u upalnom procesu ili hroničnom upalnom procesu, često prethode kancerogenezi. Fenolna jedinjenja iz biljaka deluju i na mnoge faktore inflamacije, delujući indirektno i na procese kancerogeneze (Karlsen i sar., 2007; Hou i sar., 2007; Tsoyi i sar., 2008). Naposljetku, pokazano je da proantocijanidini, različiti tanini, genistein, kurkumin, rezveratrol, epigalokateihin galat i antocijanini sprečavaju migraciju malignih ćelija i metastaziranje *in vitro* i *in vivo* (Slivova i sar., 2005; Tanimura i sar., 2005; Chen i sar., 2006; Ogasawara i sar., 2007).

Zbog strukturne raznovrsnosti različitih fitohemikalija koje ulaze u njihov sastav, etarska ulja takođe privlače veliko interesovanje istraživača u ovoj oblasti. Pokazano je da mnoga



etarska ulja ispoljavaju citotoksičnu aktivnost i da mogu biti korisna u prevenciji i terapiji različitih oblika karcinoma (Edris, 2007; Kaefer i Milner, 2008). Primenom etarskih ulja smanjen je stepen maligniteta i inhibirana proliferacija tumorskih ćelija kod leukemije (Manosroi i sar., 2006; Lampronti i sar., 2006), glioma (Cavalieri i sar., 2004), neuroblastoma (Lee i sar., 2005), melanoma (Calcabrini i sar., 2004), karcinoma jetre (Li i sar., 2004) i debelog creva (De Sousa i sar., 2004). Pokazano je da terpenoidni i fenolni konstituenti etarskih ulja sprečavaju proliferaciju tumorskih ćelija kroz indukciju nekroze i apoptoze (Dudai i sar., 2005; Bakkali i sar., 2008). Zahvaljujući svojim osobinama antioksidanata, etarska ulja deluju na mitohondrijalne funkcije ćelija sisara a kao rezultat toga dolazi do smanjenja intenziteta ćelijskog metabolizma, mitohondrijalne hiperprodukcije i konstantnog oksidativnog stresa prisutnog kod malignih tumorskih ćelija (Czarnecka i sar., 2006). Etarskim uljima su pripisana i antimutagena svojstva (Bhalla i sar., 2013) koja se ostvaruju preko više mehanizama uključujući inhibiciju ulaska mutagena u ćeliju ili aktivaciju enzima za detoksifikaciju mutagena kao i antioksidativnu aktivnost prema radikalu nastalom dejstvom mutagena i aktivacijom antioksidativnih enzima (Sharma i sar., 2001). Pored toga, etarska ulja koja se koriste u aromaterapiji deluju na poboljšanje imunog sistema (Seo, 2009).

Iako su u periodu od 1940. do 2006. godine čak više od polovine prepisanih međunarodno odobrenih antikancerogenih lekova bili prirodni produkti ili njihovi derivati (Newman i Cragg, 2007) i dalje postoji veliki interes za jedinjenja izolovana iz biljaka kao mogućih izvora novih antikancerogenih agenasa. U većini dostupnih studija koje su se bavile proučavanjem efekta jedinjenja biljnog porekla na procese kancerogeneze dokazana je njihova izuzetna antiproliferativna aktivnost, pre nego potpuna citotoksičnost. Zaustavljanje proliferacije tumorskih ćelija smatra se indirektnom citotoksičnošću jer podrazumeva reproduktivnu ćelijsku smrt, odnosno ćelije karcinoma ostaju žive ali dolazi do inhibicije njihovog rasta i proliferacije. Ovako selektivanim mehanizmima okolne zdrave ćelije ostaju neoštećene i omogućavaju mnogo brži i potpuniji oporavak pacijenata u odnosu na često veoma agresivnu terapiju sintetičkim citostaticima.

### 1.2.3. Antimikrobna aktivnost

Čovek je koristio biljke i biljne ekstrakte i jedinjenja za lečenje ali i čuvanje hrane još pre nego što je saznao za postojanje mikroorganizama koji su uzročnici oboljenja ljudi ili kvarenja hrane. Aromatične vrste su se koristile još u Starom Egiptu za balzamovanje i sprečavanje rasta mikroorganizama koji izazivaju truljenje. Međutim i u današnje vreme, čak i u razvijenijim zemljama, vrlo su česta oboljenja izazvana neispravnom hranom odnosno namirnicama koje sadrže patogene mikroorganizme. Pored toga, infektivne bolesti prouzrokovane različitim sojevima patogenih mikroorganizama danas su jedan od vodećih uzroka smrti u svetu (Hall-Stoodley i sar., 2004). Prema informacijama IARC infekcije različitim bakterijama i virusima su uzročnici značajnog procenta karcinoma (<https://goo.gl/nezXWr>). Nažalost, porast upotrebe antimikrobnih medikamenata poslednjih decenija uzrokovao je i porast rezistencije tretiranih mikroorganizama prema aktivnim komponentama najčešće korišćenih sintetičkih agenasa (Sa i sar., 2011).

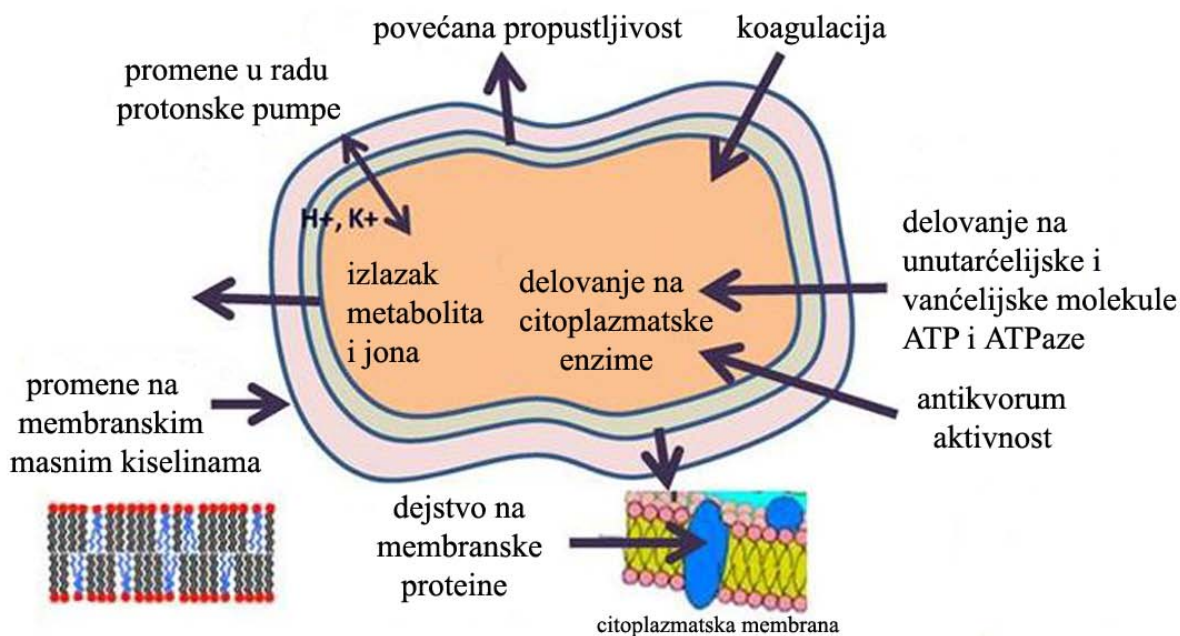
Jedan od najčešćih uzročnika ozbiljnih infekcija među hospitalizovanim pacijentima, koje mogu zahvatiti različite delove organizma jeste Gram (-) bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (Sousa i Pereira, 2014). Bakterija *Escherichia coli* koja predstavlja normalni deo crevne mikroflore kod osoba sa oslabljenim imunitetom može dovesti do intestinalnih i urinarnih infekcija, kao i meningitisa (Levine, 1984). Gram (+) *Staphylococcus aureus* izaziva klinička oboljenja nazvana stafilokokoze. Ovaj patogen se u bolnicama često javlja u obliku MRSA (eng. *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) koji je razvio rezistentnost na penicilin ali i na meticilin i slične agense (Holland i sar., 2014). *Salmonella typhimurium* i *Listeria monocytogenes* su česti izazivači trovanja hranom, izazivaju salmonelozu odnosno listeriozu koje mogu davati vrlo komplikovanu kliničku sliku i biti kobne kod osoba sa oslabljenim imunitetom ili trudnica (Olsen i sar., 2001; Ramaswamy i sar., 2007).

Takođe, invazivne gljivične infekcije se dovode u vezu sa različitim zdravstvenim problemima kod ljudi (Sardi i sar., 2013). Mikotoksini su izazivači mnogih akutnih i hroničnih oboljenja ljudi dok neki od njih deluju mutageno i/ili kancerogeno (Jay i sar., 2005; Reddy i sar., 2010). Mikotoksini gljiva iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i

*Trichoderma* mogu se pojaviti u biljkama i dovesti do kontaminacije hrane koju koriste životinje i ljudi (Madheswaran i sar., 2004; Sokolović i Šimpraga, 2006; Hedayati i sar., 2007). Patogeni poput vrsta *Candida spp.* i *Aspergillus spp.* izazivaju značajne komplikacije u populaciji sa oslabljenim imunitetom dok je broj delotvornih antifungalnih lekova limitiran (Kathiravan i sar., 2012).

Poznato je da etarska ulja izolovana iz različitih biljnih vrsta pokazuju citotoksičnu aktivnost u *in vitro* eksperimentima na veliki broj Gram (+) i Gram (-) bakterija (Kalemba i Kunicka, 2003; Burt, 2004; Si i sar., 2006; Teixeira i sar., 2013) i gljiva (Manohar i sar., 2001; Hammer i sar., 2002).

Zahvaljujući svojoj lipofilnosti etarska ulja prolaze kroz ćelijski zid i citoplazmatsku membranu i dovode do promena u strukturi polisaharida, masnih kiselina i fosfolipida utičući na propustljivost membrane (Slika 1.8). Povećana propustljivost membrane je povezana sa gubitkom jona i smanjenjem membranskog potencijala što utiče na rad protonskih pumpi i smanjenje ATP pula (Ultee i sar., 2002; Di Pasqua i sar., 2007; Saad i sar., 2013). Kod eukariotskih ćelija etarska ulja uzrokuju čak i depolarizaciju membrana mitohondrija delujući na fluks  $Ca^{2+}$  jona (Novgorodov i Gutz, 1996; Vercesi i sar., 1997). Propustljivost unutrašnje i spoljašnje membrane mitohondrija vodi ka apoptozi i nekrozi (Yoon i sar., 2000; Armstrong, 2006). Povećanje propustljivosti eukariotske membrane dodatno dovodi do gubitka citohroma C,  $Ca^{2+}$  jona i proteina kao i u slučajevima oksidativnog stresa. Može se reći da etarska ulja uzrokuju lančane reakcije na membranama počev od spoljašnje membrane preko membrana različitih organela kao što su mitohondrije i peroksizomi. Ove posledice delovanja etarskih ulja ukazuju na prooksidativnu aktivnost koja odgovara mehanizmima delovanja fenolnih jedinjenja (Sakagama i sar., 1999; Fukumoto i Mazaza, 2000; Sakihama i sar., 2002; Burt, 2004; Barbehenn i sar., 2005), čineći etarska ulja odličnim antibakterijskim i antimikrobnim agensima (Dorman i Deans 2000; Lambert i sar., 2001; Alviano i sar., 2009; Kuete i sar., 2010).



**Slika 1.8.** Mehanizam aktivnosti i ciljna mesta delovanja etarskih ulja u bakterijskoj ćeliji. Predstavljena shema je modifikovana prema Nazzaro i sar., 2013.

Etarska ulja mogu dovesti do koagulacije citoplazme i oštećenja lipida i proteina (Ultee i sar., 2002; Burt, 2004). Konačno, oštećenja membrane i ćelijskog zida mogu dovesti do gubitka makromolekula i lize ćelije (Cox i sar., 2000; Oussalah i sar., 2006).

Antibakterijska efikasnost zavisi od vrste ulja kao i od vrste bakterija na koju se etarsko ulje primenjuje (Raut i sar., 2014). Neka ulja su vrlo efikasna protiv Gram (+) bakterija a ne ispoljavaju antibakterijsku aktivnost prema Gram (-) bakterijama (Hammer i sar., 1999; Hammer i Carson, 2011). Generalno, od etarskih ulja biljaka koje su u širokoj upotrebi, etarska ulja majčine dušice, origana, čajevca, cimeta, matičnjaka, lovora i karanfilića pokazuju veoma jako antibakterijsko dejstvo. Antibakterijsku aktivnost ova etarska ulja ispoljavaju pri koncentracijama < 1% (v/v) (Hammer i sar., 1999; Oualalah i sar., 2006). Uopšteno, etarska ulja sa fenolnim i aldehidnim komponentama pokazuju snažnu

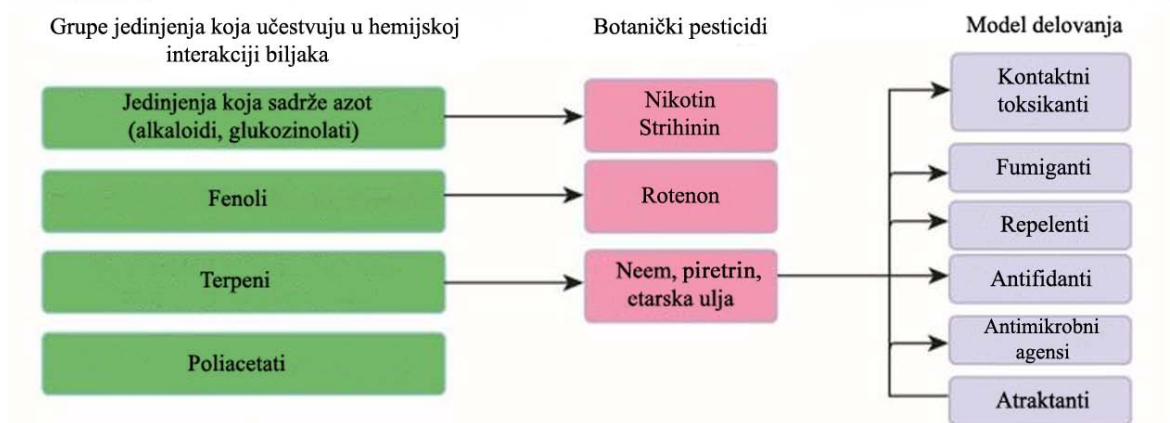
antibakterijsku aktivnost (Lambert i sar., 2001; Ultee i sar., 2002; Carson i sar., 2006) a posebno aktivnim se smatraju karvakrol, timol, eugenol i terpinen-4-ol.

Delovanjem etarskih ulja inhibirani su rasteenje i razviće spora mnogih patogenih gljiva. Ova ulja sadržavala su pre svega fenilpropanoide kao što je eugenol i monociklične seskviterpene kao što je  $\alpha$ -bisabolol (Maxia i sar., 2009; Pragadheesh i sar., 2013). Etarska ulja bogata terpenima su ispoljila aktivnost prema glavnom humanom gljivičnom patogenu *C. albicans* (Zore i sar., 2011b). Jedan od efekata etarskih ulja na *C. albicans* je inhibicija ćelijskog ciklusa (Zore i sar., 2011a). Antifungalna aktivnost etarskih ulja je omogućena i preko inhibicije signalnog puta koji dovodi do morfogeneze hifa (Agarwal i sar., 2008).

Literaturni podaci ukazuju da etarska ulja mogu kontrolisati rast patogenih bakterija i gljiva koje se mogu naći u hrani (Brehm-Stecher i Johnson, 2003; Santiesteban-López i sar, 2007; Gallucci i sar., 2009) kao i da mogu biti resurs medikamenata za različita oboljenja čiji su uzročnici patogeni mikroorganizmi (Rios i Recio, 2005; Reichling i sar, 2009; Silva i Fernandes Júnior, 2010).

#### **1.2.4. Insekticidna aktivnost**

Upotreba sintetičkih hemikalija u kontroli herbivornih insekata štetočina stvara sve više problema po ljudsko zdravlje i životnu sredinu. Kao alternativa njima nude se prirodni produkti koji poseduju repelentnu i insekticidnu aktivnost a ne ugrožavaju zdravlje ljudi ni složene biotičke interakcije koje postoje u svakom ekosistemu (Slika 1.9). Međutim, uprkos razvijenoj svesti o prednostima u odnosu na sintetičke pesticide, prirodni pesticidi i dalje nemaju važno mestu na tržištu. Bioinsekticidi, dominantno oni zasnovani na primeni kristalnih proteina izolovanih iz bakterijskog soja *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Kumar i sar. 1996), kao i botanički insekticidi zasnovani pre svega na produktima na bazi piretrina zauzimaju manje od 1% globalnog tržišta (Isman, 2000). Ipak, poslednjih godina intenzivno se ispituje efekat etarskih ulja kao botaničkih insekticida koji su biorazgradivi, nisko toksični i pružaju mogućnost za održivu kontrolu insekatskih populacija.



**Slika 1.9.** Grupe biljnih jedinjenja koje se koriste kao botanički pesticidi i njihovi modeli delovanja.

Još pre otkrića modernih pesticida biljni ekstrakti koji su sadržavali nikotin i piretrin su se koristili kao insekticidi u poljoprivredi. Savremena nauka pokazala je da etarska ulja mnogih biljnih vrsta ispoljavaju aktivnost protiv različitih larvi (Hierro i sar., 2004; Pavela, 2005; Morais i sar., 2006) i adultnih insekata (Lamiria i sar., 2001; Yang i Ma, 2005; Cheng i sar., 2007), pri čemu se kod tretiranih insekata menja način i intenzitet ishrane (antifidno dejstvo) i/ili dolazi do uginuća (insekticidno dejstvo) (Cloyd i Chiasson, 2007; Dolan i sar., 2007; Kiran i Devi, 2007; Chaubey i sar., 2008; Jiang i sar., 2009; Abdelgaleil i sar., 2012).

Komponente etarskih ulja koje ispoljavaju insekticidno dejstvo spadaju u grupu fenola i terpena (Rattan, 2010). Terpeni ulaze u sastav različitih smola koje deluju insekticidno, (Golob i sar., 1999) dok mešavine koje sadrži različite terpene mogu posedovati čak i veću toksičnost s obzirom na to da terpeni sinergizuju dejstvo drugih toksina, delujući kao rastvarači koji olakšavaju prolazak kroz membranu (Rattan, 2010).

Etarska ulja deluju na insekte preko kontakta, digestije ili inhalacije pri čemu njihova aktivnost može biti repelentna, fumigantna ili insekticidna. O mehanizmima insekticidnog delovanja etarskih ulja se još nedovoljno zna. Smatra se da terpeni iz etarskog ulja imaju negativan efekat na nervni sistem i razviće insekata. Oni mogu imati ulogu hormonskih analoga, inhibitora rasta ili da poseduju aktivnost vezivanja specifičnih proteina. Etarska

ulja mogu delovati neurotoksično ili mogu da utiču na regulatore rasteња delujući tako na morfogenezu insekata (Reynolds, 1987; Balandrin i Klocke, 1988). Simptomi neurotoksičnog delovanja su hiperaktivnost i tremor koji brzo vode ka padu, nepokretnosti i paralizi (Enan, 2001). Piretrin, insekticid izolovan iz etarskog ulja buhača, *Tanacetum cinerariifolium*, deluje neurotoksično i dovodi do paralize insekata (Casida, 1973). Uopšteno, piretrin i jedinjenja slična piretrinu deluju na rano aktiviranje Na<sup>2+</sup> kanala uzrokujući povećani ulazak ovih jona u neuronima (Evans, 1984). Vrlo često dolazi do paralize vilice insekata što dovodi do prestanka unosa hrane i smrti usled izgladnjivanja (Rattan, 2010). Pokazano je da etarska ulja deluju kao inhibitori acetilholinesteraze, što uzrokuje konstantnu stimulaciju koja vodi ka nedostatku koordinacije nervnomišićnog sistema i smrti (Keane i Ryan, 1999; Mills i sar., 2004; Shaaya i Rafaeli 2007). Tujon iz etarskog ulja je klasifikovan kao neurotoksični insekticid koji deluje na GABA receptore (Hold i sar., 2000; Ratra i Casida, 2001). Insekticidno dejstvo ostvaruje se i delovanjem na protonske pumpe i enzimske sisteme kao što su ATPaze (Cheng, 2007). Linalool je jedan od monoterpenskih konstituenata etarskog ulja koji deluje na nervni sistem utičući na transport jona i oslobađanje acetilholin esteraze kod insekata dok timol, karvakrol i eugenol blokiraju oktopaminske receptore kod insekata (Enan, 2005; Price i Berry, 2006).

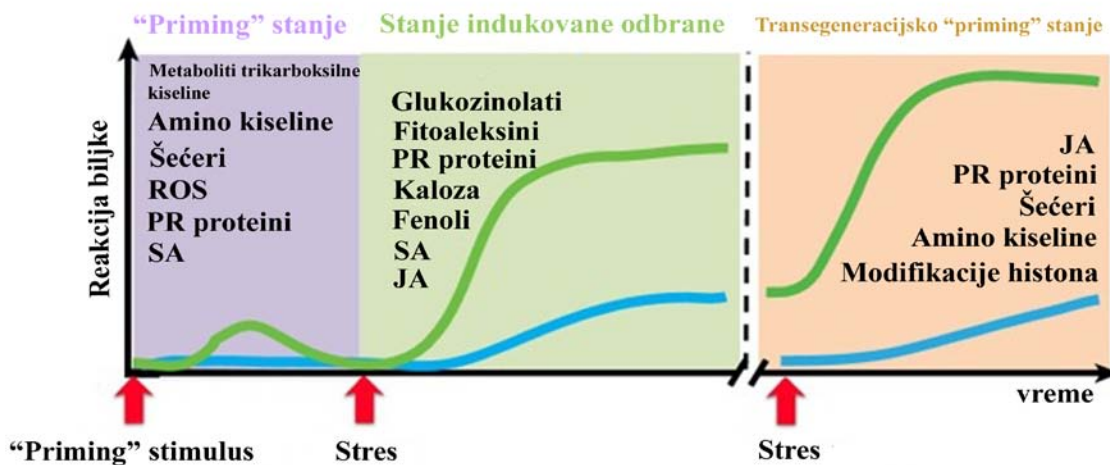
Pregledom dostupnih podataka o komercijalizaciji pesticida zasnovanih na etarskima uljima uviđaju se prepreke koje se tiču nestašice prirodnih resursa, potrebe za hemijskom standardizacijom i kontrolom kvaliteta i poteškoća prilikom registracije proizvoda.

### **1.3. Uloga etarskih ulja u indukciji odbrambenih mehanizama susednih biljaka**

Biljke su tokom evolucije razvile veliki broj mehanizama kojima se brane od štetočina, insekata i patogenih bakterija, virusa i gljiva. Pored konstitutivne, značajane mehanizme zaštite predstavljaju i različiti oblici inducibilne zaštite koji uglavnom podrazumevaju produkciju širokog spektra sekundarnih metabolita koji na različite načine deluju protiv štetočina. Kao što je već ranije napomenuto, etarska ulja predstavljaju smeše isparljivih jedinjenja sa velikim brojem bioloških uloga razvijenih tokom evolucije. Osim što mogu delovati repelentno, mnoga od jedinjenja prisutnih u etarskim uljima pokazuju direktan

efekat na preživljavanje, rastenje i razviće štetočina te se sve više ovi specifični rezervoari hemijskih jedinjenja izučavaju i u kontekstu alternative sintetičkim pesticidima. Ipak, poslednjih godina veliko interesovanje istraživača širom sveta privlače istraživanja kojima je pokazano da isparljiva jedinjenja pojedinačno ali i etarska ulja kao specifične smeše ovih jedinjenja, mogu indukovati odbranu gajenih biljnih kultura i podići njihovu odbrambenu moć prema herbivorima ili abiotičkom stresu (Arimura i sar. 2000; Engelberth i sar. 2004).

Naime, biljke su kao rezultat konstantne izloženosti promenjivim uslovima spoljašnje sredine, kao i prisustvu patogena i štetočina, razvile poseban oblik indukovane odbrane koji podrazumeva reakcije kojima se biljka priprema za sledeći nalet nepovoljnih uslova ili napada, dovodeći sebe u "priming" stanje. "Priming" (eng. *prime*-pripremiti se) se može definisati kao indukcija fiziološkog stanja u kome biljka na biotički ili abiotički stres reaguje brže, snažnije i efikasnije (Conrath i sar., 2002) zahvaljujući unapred pripremljenim odbrambenim resursima. U promenjivim uslovima sredine potencijal biljke da se dovede u "priming" stanje može biti krucijalan za njeno preživljavanje. Iako je do danas ostalo puno nerazjašnjenih pojedinosti vezanih za ovaj fenomen, Gamir i saradnici (2014) su predložili uopšteni koncept po kome "priming" podrazumeva nekoliko faza (Slika 1.10).



Slika 1.10. "Priming" faze i odgovor biljaka na "priming" stimulus i stres.



Po ovoj shemi “priming” započinje odmah po delovanju “priming” stimulusa (signala različite hemijske prirode, abiotičkog stresa, napada patogena) i traje sve dok je stimulus prisutan. Tokom ove faze nivo primarnih i sekundarnih metabolita, enzima, fitohormona i drugih molekula uključenih u odbrambene reakcije je blago povišen i biljka je u stanju pripravnosti. Regulacija genske ekspresije koja se dešava u ovoj fazi je vidljiva tek u sledećoj “priming” fazi. Nakon prestanka delovanja stimulusa biljka se nalazi u stanju indukovane odbrane koje obuhvata odgovarajuće reakcije kao odgovor na delovanje stimulusa a podrazumeva stanje povišene otpornosti na stres. Prema ovoj shemi poslednja faza podrazumeva transgeneracijsko “priming” stanje koje se sreće kod biljaka formiranih iz semena roditelja koji su se tokom života nalazili u “priming” stanju te su razvili “priming” pamćenje, što im omogućava bržu i adekvatniju reakciju na stresni stimulus.

Osim što biljka može dospeti u “priming” stanje nakon što je prethodno bila izložena abiotičkom stresu ili patogenima, zanimljivo je otkriće da se ovo stanje može indukovati i nakon prijema “signala” koji su emitovani od strane susedne biljke koja je bila neko vreme pod delovanjem faktora abiotičkog ili biotičkog stresa. Pretpostavka o postojanju hemijskog signala koji se prenosi sa stresiranih ili povređenih biljaka na okolne biljke i indukuje “priming” dugo je izazivala kontroverzu, sve do prvih publikacija koje su otkrile naučne činjenice o prirodi ovih signala i komunikaciji među biljkama koja se njima ostvaruje, a koje su se pojavile početkom osamdesetih godina XX veka (Baldwin i Schultz, 1983; Rhoades, 1983; Fowler i Lawton, 1985). U pionirskom radu Baldwin i Schultz (1983) su govoreći o “pričajućem drveću” (u originalu “*talking trees*”) pokazali da topole (*Populus x euroamericana*) i klijanci javora (*Acer saccharum* Marsh) tokom 75 sati od mehaničkog povređivanja povećavaju koncentraciju fenola u ekstraktima povređenih listova ali i da se u okolnim nepovređenim biljkama takođe povećala koncentracija fenola i tanina, sugerišući da je “isparljivi činilac” emitovan sa povređenih listova indukovao ovu promenu koja može imati efekta na ishranu i razviće herbivornih larvi.

O prirodi signala, odnosno smeši isparljivih organskih jedinjenja (VOC; eng. *Volatile Organic Compounds*) kojima biljke međusobno komuniciraju i koji ima potencijal da indukuje odbranu okolnih biljaka danas se dosta zna. Ovde su posebno značajne smeše

jedinjenja koje se emituju nakon napada herbivora (HIPVs; eng. *Herbivore-Induced Plant Volatiles*) a čiji sastav je karakterističan za biljnu vrstu koja ih emituje kao i herbivora koji je svojim napadom indukovao emisiju ovih jedinjenja (Takabayashi i Dicke, 1996; de Moraes i sar., 1998; Du i sar., 1998; Dicke, 1999a). U nekim slučajevima sastav ovih smeša se može razlikovati u zavisnosti da li je emisiju izazvao herbivor ili mehaničko povređivanje (Boland i sar., 1999; Dicke, 1999b).

Na koji način će emitovani signal dospeti do susedne biljke zavisi od mnogo faktora. Smer i dinamika kretanja kroz atmosferu biće određeni temperaturom i kretanjem vetra (Baldwin i sar. 2006). Tako će mali lako isparljivi molekuli kao što su etilen, metanol, izopren i neki monoterpeni difundovati brzo ali će se njihova koncentracija značajno smanjiti nakon prodiranja u atmosferu te je malo verovatno da će oni biti deo informacije koju će susedna biljka primiti. S druge strane, manje isparljiva jedinjenja kao što su terpeni alkoholi, metil jasmonat (MeJA), aromatična jedinjenja i isparljiva jedinjenja listova (GLVs; eng. *Green-Leaf Volatiles*; uglavnom se sastoje od produkata degradacije C18 masnih kiselina), predstavljaju signale koji se prenose na veće razdaljine. Na najintenzivnije proučenom i najbolje opisanom primeru komunikacije između duvana i mehanički povređenih biljaka *Artemisia* (Karban i sar., 2000; Karban i Maron, 2002; Karban i sar., 2004) pokazano je kako visoko isparljivi metakrolein biva praćen manje isparljivim GLVs jedinjenjima kao što su *cis*-3-heksenalom i *trans*-2-heksenalom, zatim oksidovanim monoterpenima (cineolom, tujonom i kamforom) i na kraju epimerima MeJA.

Do sada je identifikovan veliki broj isparljivih jedinjenja za koja je potvrđeno da mogu da indukuju "priming" (Engelberth i sar., 2004; Arimura i sar., 2009; Matthes i sar., 2010). U najvećem broju slučajeva to su jasmonati (Farmer i Ryan, 1990; Matthes i sar., 2010), fenolna jedinjenja kao što je metil salicilat (Shulaev i sar. 1997), terpeni (Arimura i sar. 2000; Paschold i sar. 2006) i neki C5-C10 alkeni i alkani, u koje spadaju GLVs kao što su (E)-2-heksenal, (Z)-3-heksenal, (Z)-3-heksenol i (Z)-3-heksenil acetat (Bate i Rothstein, 1998; Kost i Heil, 2006; Kishimoto i sar. 2005).

Još na samom početku ovih istraživanja, Farmer i Ryan (1990) su pokazali da metil-jasmonat, čest sekundarni metabolit biljaka, apliciran na površinu listova paradajza

uzrokuje sintezu inhibitora proteinaza kod tretirane biljke ali i kod susednih biljaka iz različitih familija. Ovi rezultati ukazuju na interspecijsku komunikaciju koja se dešava između listova različitih biljaka i indukuje ekspresiju odbrambenih gena. S druge strane, kod *Phaseolus lunatus* je pokazano da se isparljiva jedinjenja (*E*)- $\beta$ -ocimen, (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrien (DMNT) i (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridekatetran (TMTT) oslobađaju kao odgovor na napad paučinara ali i da istovremeno upravo ova jedinjenja indukuju promene u ekspresiji lipoksigenaze (LOX, koja je ključan enzim u sintezi JA), farnesil pirofosfatne sintaze (FPS, uključena u biosintezu izoprenoidnih jedinjenja) i PR (eng. *pathogenesis related*) gena koji su uključeni u različite mehanizme odbrane kod biljaka, u inataktivnim listovima napadnutih biljaka (Arimura i sar. 2000). U novijim istraživanjima na kukuruzu je pokazano da kod klijanaca izloženih terpenima sa okolnih biljaka, nakon mehaničke povrede ili nanošenja pljuvačke herbivornih gusenica, dolazi do značajno veće akumulacije jasmonske kiseline i isparljivih seskviterpena nego kod klijanaca koji prethodno nisu bili izloženi ovim isparljivim jedinjenjima (Ruther i Fürstenau, 2005).

Iako je mehanizam indukcije sinteze i delovanja ovih jedinjenja i dalje u najvećoj meri nepoznat pretpostavlja se da se indukcija ekspresije odbrambenih gena dešava najverovatnije preko signalnih puteva koji uključuju influx jona  $Ca^{2+}$ , proteinsku fosforilaciju/defosforilaciju i aktivnosti ROS (Asai i sar., 2009). Promene u membranskom naponu ( $V_m$ ) takođe su izmerene nakon izlaganja listova GLVs te se pretpostavlja da reakcija isparljivih jedinjenja sa membranskim proteinima vodi ka promeni transmembranskog potencijala i dalje ka indukciji pojedinačnih gena (Kishimoto i sar. 2006). Izlaganje biljaka paradajza (*Lycopersicon esculentum*) isparljivim jedinjenjima čiju je emisiju indukovao napad herbivora (HIPVs),  $\alpha$ -pinenu i  $\beta$ -kariofilenu u koncentraciji od 50 ppm izazvalo je intenzivnu i brzu depolarizaciju koja je bila i još efektivnija kada su primenjene više koncentracije, od 100 i 300 ppm (Zebelo i sar., 2012).

Karakterizacija svih promena koje se dešavaju tokom “priming” zahteva poznavanje genetike i korišćenje proteomike, metabolomike i drugih metoda. Istraživanja su do sada bila usmerena ka profilisanju ekspresije gena koji učestvuju u odbrambenom odgovoru a

nalaze se na signalnom putu salicilne, jasmanske kiseline ili etilena, akumulaciji mitogen aktivirajućih protein kinaza (MAPK) i produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta (Molitor i sar., 2011; Brotman i sar., 2012; Massoud i sar., 2012; Sheigk i sar., 2014), dok su proteomički i metabolomički mehanizmi i dalje nedovoljno poznati.

Za sada je nemoguće imati kompletnu sliku svih promena koje se dešavaju u “priming” fazama a one zavise od vrste biljke, primarnog stimulusa za “priming” i vrste stresa sa kojim se biljke suočavaju. Takođe je potrebno saznati i kako se biljke koje se nalaze u stanju indukovane odbrane suočavaju sa kombinovanim stresom, istog tipa ili kombinacijom biotičkih i abiotičkih stresora. Postoje još mnoga otvorena pitanja na ovu temu koja će se možda rešiti i povezivanjem novih informaciju iz ovog polja u jedan celovit sistem podataka. Ovakav sistem koji omogućava razmenu podataka jeste Data-Enabled Life Sciences Alliance (DELSA Global) koji sadrži multidisciplinarne podatke različitih –omika i koji će možda rasvetliti mnoga pitanja koja nameće “priming” (Kolker i sar., 2014). Zbog toga što “priming” pruža efikasnu odbranu a nema negativan efekat na fitness biljke, “priming” metode mogu biti vrlo dragocene u strategiji zaštite useva (Balmer i sar., 2015).

#### **1.4. Taksonomski položaj, biološke i fitohemijske karakteristike vrste *Tanacetum vulgare* L.**

Rod *Tanacetum* pripada brojnoj i široko rasprostranjenoj porodici *Asteraceae* (Compositae). Vrste ove porodice najčešće naseljavaju aridne i semiaridne regione subtropske i umerene temperaturne zone. Ova porodica obuhvata preko 30 000 vrsta podeljenih u 1 900 rodova (The Plant List, 2013). U okviru porodice *Asteraceae* nalazi se tribus *Anthemideae* koji obuhvata rodove kao što su *Artemisia*, *Achillea*, *Matricaria* i *Tanacetum* sa mnogim aromatičnim, lekovitim i vrstama bogatim biološki aktivnim jedinjenjima (Abad i sar., 1993; Williams i sar., 1999a, 1999b; da Silva, 2004; Kumar i Tyagi, 2013).

Rod *Tanacetum* obuhvata oko 200 vrsta rasprostranjenih u umerenoj zoni severne hemisfere, nativnih na teritoriji Evrope i zapadne Azije ali i introdukovanih u ostale delove sveta (Heywood, 1976; da Silva, 2004). Vrste ovog roda su najčešće bogate etarskim uljima

ali i drugim biološki aktivnim sekundarnim metabolitima, kao što su seskviterpeni i flavonoidi (Gören i sar., 1996a, 1996b; Williams i sar., 1999; Long i sar., 2003; Tepe i Sokmen, 2007; Kumar i Tyagi, 2013). *Tanacetum parthenium* je vrsta koja je u evropskoj farmakopeji svrstana među tradicionalne biljne droge koji se koriste kao profilaksa kod migrene (Wichtl, 2004). Iz ove vrste je izolovan i partenolid, seskviterpenski lakton koji je između ostalog pokazao i aktivnost protiv tumorskih ćelija (Wen i sar., 2002; Pareek i sar., 2011). Etarska ulja i ekstrakti vrsta *T. densum* i *T. balsamita* ispoljili su antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost (Gören i sar., 1992; Tepe i Sokmen, 2007; Baçzek i sar., 2017) a *T. microphyllum* i *T. marvatum* su vrste bogate flavonoidima koji pokazuju antiinflamatorno dejstvo (Abad i sar., 1993; Martinez i sar., 1997). Ekstrakti *T. cilicium*, *T. morymbosum* i *T. macrophyllum* ispoljavaju značajnu antikoagulantnu aktivnost (Thomas, 1989). Dalmatinski buhač, *T. cinerariifolium*, je vrsta koja se odavno koristi kao botanički insekticid jer sadrži piretrine, jedinjenja koja ispoljavaju jaku insekticidnu aktivnost i nisku toksičnost prema sisarima (Casida, 1980; Katsuda, 1999; Kikuta i sar., 2012).

*Tanacetum vulgare* L. (syn. *Chrysanthemum vulgare* L., eng. *tansy*) je višegodišnja, zeljasta biljka, poreklom iz Evrope i centralne Azije koja se obično sreće duž puteva, pruga, pašnjaka i polja ali i priobalnih područja i drugih vlažnih staništa (Heywood, 1976). U Srbiji je poznata pod narodnim imenima povratič, vratizelja, grliček i konopljika (Milovanović, 2005). Biljka raste do 1-1,5 m visine, sa višeugaonom stabljikom prekrivenom retkim dlakama. Listovi su dugački, jednostavno do dvostruko perasto deljeni, prekriveni dlačicama, na krajevima nazubljeni, tamnozelene boje i dužine do 30 cm. Cvetovi su dosta sitni i združeni u žute glavice koje formiraju bogatu cvast (Slika 1.11). Biljka cveta u periodu od jula do septembra. Plod je sitna ahenija sa pet uzdužnih rebara, dužine do 1 cm. Koren je kratak, vretenastog obika i granat.



**Slika 1.11.** *Tanacetum vulgare* L.

U Srbiji *T. vulgare* pripada sinurbanoj (ruderalnoj) flori koja pripada korovskoj flori u širem smislu (Jovanović, 1994). Za razliku od korovske flore u širem smislu gde spadaju segetalni korovi poljoprivrednih kultura, ruderalna flora se održava na staništima koja su pod stalnim uticajem čoveka ali ne u cilju stvaranja poljoprivrednih površina.

Engleski naziv vrste "*tansy*" dolazi od grčke reči "*thanatos*" što znači besmrtnost, a može se povezati sa činjenicom da cvetovi ove vrste ne trule kada uvenu. Ove karakteristike su doprinele tome da su vekovima listovi *T. vulgare* korišćeni za balzamovanje (Haughton, 1978; Zimdahl, 1989). Postoji podatak da je ova vrsta gajena u bašti manastira Sankt Galen u Švajcarskoj, u srednjem veku i da su je benediktinski monasi koristili u tretmanima protiv crevnih parazita, reume, groznice i digestivnih problema (LeStrange, 1977). U Evropi i kolonijalnoj Americi meso namenjeno ishrani ljudi umotavano je u listove *T. vulgare* da bi se sprečilo truljenje i odbili insekti (Haughton, 1978). Tucakov (1997) navodi da je *T. vulgare* gajen u baštama srpskih srednjevekovnih manastira i da je bio jedna od 16 "svetih" biljaka koje su monasi koristili za lečenje različitih tegoba. U narodnoj medicini našeg

podneblja ova biljka se koristila protiv crevnih parazita, migrene, neuralgije, reumatizma i kod gubitka apetita (Kojić i sar., 1998; Kišgeci, 2008; Jarić i sar., 2015).

Zahvaljujući svojoj aromatičnosti *T. vulgare* se koristi i kao začinski aditiv u ishrani (Grieve, 1984; Mabey, 1996) a zahvaljujući svojoj biološkoj aktivnosti koristi se kao biljna droga (van Wyk i Wink, 2004). Sirova droga, Tanaceti flos, koristi se godinama u nekim zapadnim farmakopejama zbog svog vermifugnog i emenagognog dejstva (Evans, 1996). U ruskoj tradicionalnoj medicini infuzija od cvetova *T. vulgare* upotrebljava se u tretmanu zarastanja rana, poboljšanja apetita i kao analgetik (Zaurov i sar., 2013).



**Slika 1.12.** Tinkture i ekstrakti *T. vulgare* koji se mogu naći na tržištu.

Tokom godina publikovani su rezultati brojnih istraživanja koja su se bavila korisnim svojstvima ekstrakata i sekundarnih metabolita ove vrste. Tako je pokazano da hloroformski, acetonski i metanolni ekstrakti cvetova i/ili listova *T. vulgare* ispoljavaju antiinflamatornu aktivnost (Mordujovich-Buschiazzo i sar., 1996; Brown i sar., 1997; Williams i sar., 1999). Lahlou je sa saradnicima (2007) demonstrirao da vodeni ekstrakt

listova ove vrste ima snažnu diuretičku aktivnost i da ne izaziva renalnu toksičnost niti ima druge štetne efekte. Isti autor (2008) je dokazao i vazodilatatorne osobine vodenog ekstrakata i time opravdao praktičnu primenu ove biljke kao antihipertenziva u farmakopeji Maroka. Vodeno-etanolni ekstrakti ispoljili su antikandidijalnu aktivnost kao i određeni stepen antibakterijske aktivnosti (Holetz i sar., 2002). Pored toga, Xie je u svom radu sa saradnicima (2007) podržao koncept da se polisaharidi iz ove biljke koriste kao imunoterapijski ađuvansi. Etil-acetatni ekstrakt *T. vulgare* i seskviterpenski lakton partenolid izolovan iz ovog ekstrakta ispoljili su aktivnost protiv herpes simplex virusa tipa I (HSV-I) (Onozato i sar., 2009). Kasnije je Alvarez sa saradnicima (2011) ukazao da su za antivirusnu aktivnost *T. vulgare* odgovorna neka druga jedinjenja a ne partenolid, ukazujući pre svega na 3,5-dikafeoilhininsku kiselinu koja je u ranijim studijama ispoljila antivirusnu i antiherpetičnu aktivnost.

Kao potvrdu tradicionalne upotrebe *T. vulgare* kao repelenta, Chiasson je sa saradnicima (2001) testirao etarsko ulje ove vrste na pauka paučinara, *Tetranychus urticae* Koch i dokazao snažno akaricidno dejstvo. Zbog repelentne aktivnosti *T. vulgare* se preporučuje kao biljka koju treba gajiti uz poljoprivredne useve, kao jedan od metoda savremenog pristupa organskog uzgajanja hrane (Nottingham i sar., 1991; Cline i sar., 2008).

Aktivnost prema mikrobima i insektima zavisi od hemijskog sastava etarskog ulja (Schearer, 1984; Holopainen i Kauppinen, 1989). Ono što je karakteristično za populacije *T. vulgare* u prirodi jeste hemijska plastičnost koja se ogleda u varijabilnosti sastava etarskog ulja što je doprinelo tome da je do sada identifikovano nekoliko desetina hemotipova ove vrste širom sveta (Nano i sar., 1979; Gallino, 1988; Holopainen, 1989; Neszmélyi i sar., 1992; Collin i sar., 1993; Keskitalo i sar., 2001; Judzentiene i Mockute., 2005). Različiti autori su identifikovali više od sto mono- i seskviterpena koji ulaze u sastav etarskog ulja *T. vulgare* što zavisi od mnogih faktora spoljašnje sredine ali i od ontogenije biljke i metode ekstrakcije (Hendriks i sar., 1990; Collin i sar., 1993; Németh i sar., 1994).



## 2. CILJEVI RADA

Polazeći od toga da je aromatična vrsta *T. vulgare* deo tradicionalne medicine Srbije i da bi mogla biti potencijalni izvor biološki aktivnih jedinjenja ova disertacija je imala za cilj hemijsku karakterizaciju etarskog ulja i metanolnih ekstrakata i ispitivanje njihove biološke aktivnosti.

Realizacija ovog cilja ostvarena je kroz nekoliko zadataka:

- \* Uspostavljanje *in vitro* sistema za propagaciju vrste *T. vulgare* i analiza hemijskih karakteristika etarskog ulja i metanolnih ekstrakata izolovanih iz ovih biljaka;
- \* Histochemijska lokalizacija sekundarnih metabolita u listovima *in vitro* gajenih biljaka;
- \* Izolacija i hemijska karakterizacija etarskog ulja i metanolnih ekstrakata biljaka *T. vulgare* sakupljenih iz prirode;
- \* Ispitivanje antioksidativnog potencijala i određivanje sadržaja ukunih fenola u metanolnim ekstraktima biljaka iz prirode;
- \* Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja i metanolnih ekstrakata na odabrane vrste patogenih bakterija i gljiva;
- \* Ispitivanje citotoksične aktivnosti etarskog ulja i metanolnih ekstrakata biljaka *T. vulgare* sakupljenih iz prirode na tumorske HeLa ćelije kao i na zdrave MRC-5 ćelije;
- \* Ispitivanje uticaja rezidualne kontaktne toksičnosti etarskog ulja *T. vulgare* na mortalitet larvi gubara (*Lymantria dispar* L.) i efekta etarskog ulja unetog hranom na performanse rastenja i razvića larvi;
- \* Ispitivanje potencijala etarskog ulja *T. vulgare* da indukuje odbrambene mehanizme krompira (*Solanum tuberosum* L.) gajenog *in vitro*.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Biljni materijal**

Biljni materijal (polen, semena, cele biljke) vrste *Tanacetum vulgare* L. je sakupljen tokom jula 2011. godine na lokaciji Ada Huja u Beogradu (44°49'20"N, 20°30'30"E). Cele biljke u fazi cvetanja su sušene na sobnoj temperaturi na promajnom mestu u hladu, do konstantne mase, dok je polen korišćen u svežem stanju. Osušeni materijal je čuvan u papirnim kesama, na sobnoj temperaturi, zaštićen od svetlosti do trenutka analize.

##### **3.1.1. Determinacija biljnog materijala**

Herbarski materijal je determinisan i deponovan u Zbirci primeraka jemstva (eng. *Vaucher collection*) Herbarijuma Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno – matematičkog fakulteta u Novom Sadu – BUNS Herbarijum (vaučer br. 2-2069).

##### **3.1.2. Analiza polena**

###### **3.1.2.1. Ispitivanje mikromorfologije polena**

Za ispitivanje mikromorfologije polena korišćen je svež materijal. Grančice sa cvetovima su prenesene u laboratoriju gde su polenova zrna pripremljena za skenirajuću elektronsku mikroskopiju (eng. *Scanning Electron Microscopy*; SEM) bez prethodne fiksacije i dehidracije. Polenova zrna sa antera su postavljena direktno na nosač pomoću dvostrano-lepljive trake, nakon čegasu naparena tankim slojem zlata pomoću vakumskog uređaja za pripremu uzoraka (BAL-TEC, SCD 005, BAL-TEC GmbH, Schalksmühle, Nemačka). Vreme naparavanja je iznosilo 100 sekundi pri struji od 30 mA. Polenova zrna su fotografisana i analizirana na skenirajućem elektronskom mikroskopu (JSM-6390LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Fotografisana su slučajno odabrana vidna polja sa polenovim zrnima. Analizirano je oko 600 polenovih zrna, a ispitivana je veličina polenovog zrna

(dužina, širina, odnos dužina/širina), polarnost, aperturacija odnosno broj otvora kao i karakteristike i ornamentacija egzine.

### ***3.1.2.2. Ispitivanje vijabilnosti polena in vitro***

Za ispitivanje vijabilnosti polena korišćena je metoda histološkog bojenja sa fluorescein diacetatom (FDA; Heslop-Harison i Heslop-Harison, 1970). FDA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka) je rastvoren u acetonu (2 mg/l) i pomešan sa 0.5M rastvorom saharoze (Torlak, Beograd, Srbija) u odnosu 1:1 (v/v). Polenova zrna su postavljena na predmetnu pločicu u tankom sloju i prekrivena sa 2-3 kapi rastvora za bojenje. Stepjen vijabilnosti polena određivan je posle 90 min tokom kojih je boja prodršla u polenova zrna. Polenova zrna su fotografisana i posmatrana na fluorescentnom mikroskopu (Carl Zeiss Axiovert, MicroImaging GmbH, Göttingen, Nemačka). Analizirano je 600 polenovih zrna a određivan je procenat vijabilnih polenovih zrna. Vijabilna polenova zrna fluorescirala su intenzivno zelenom bojom.

### ***3.1.2.3. Ispitivanje klijavosti polena in vitro***

Za ispitivanje vitalnosti polena korišćen je test klijavosti u uslovima *in vitro* na agarosaharoznoj podlozi. Isključavanje polena vršeno je u tri Petri posude prečnika 35 mm, sa po 3 mL hranljive podloge koja je sadržala 1,5% agara, 3% borne kiseline (Duchefa, Haarlem, Holandija) i različite koncentracije saharoze: 1,5, 10, 20 i 30%. Zasejavanje polena vršeno je finom četkicom radi dobijanja što ujednačenijeg rasporeda polenovih zrna po podlozi. Nakon perioda inkubacije od 15 i 24 sata na temperaturi od  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , određivan je procenat proklijalih polenovih zrna. Polenovo zrno se smatralo klijalim kada je dužina polenove cevi bila jednaka ili duža od prečnika polenovog zrna. Polenova zrna su fotografisana i posmatrana na svetlosnom mikroskopu (Carl Zeiss Axiovert, MicroImaging GmbH, Göttingen, Nemačka). Dužina polenove cevi merena je nakon 15, 18, 21 i 24 sata. Po svakoj Petri kutiji posmatrano je 10 slučajno odabranih vidnih polja a svako je sadržalo između 20 i 30 polenovih zrna.

### 3.2. Gajenje biljaka u uslovima *in vitro*

Sa ciljem upoznavanja potencijala vrste *T. vulgare* da u kontrolisanim uslovima vrši produkciju sekundarnih metabolita uspostavljena je kultura *in vitro*.

Sve hranljive podloge, laboratorijski sudovi kao i instrumenti za rad su sterilisani prema standardnim procedurama kulture biljaka *in vitro* u autoklavu (Raypa® AE75, Barcelona, Španija) na temperaturi od 114°C i pritisku od 80 kPa u trajanju od 25 minuta (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996). Rad sa biljnim materijalom vršen je u aseptičnim uslovima u laminarnoj komori (Termovent, Užice, Srbija). Sve kulture su gajene na temperaturi od 25 ± 2 °C i fotoperiodu od 16 h svetlosti i 8 h mraka (uslovi dugog dana). Kao izvor svetlosti korišćene su fluorescentne lampe ("Tesla", Pančevo, Srbija) jačine 65W, 4500 K igustine svetlosnog fluksa od 47 ± 2 μmol/(m<sup>2</sup> s).

#### 3.2.1. Uspostavljanje kulture *in vitro*

Za uspostavljanje kulture *in vitro* korišćena su semena *T. vulgare* sakupljena sa biljaka iz prirode. Semena (oko 400) su površinski sterilisana ispiranjem tekućom vodom tokom 10 min, uz dodatak nekoliko kapi komercijalnog deterdženta (Fairy, Procter & Gamble, Ohio, SAD). Nakon toga sledilo je inkubiranje tokom 30 min u 30% rastvoru varikine (4% NaClO, Panonija, Pančevo, Srbija) uz mućkanje na horizontalnoj mešalici (85 rpm) a zatim je ponovljena inkubacija sa 15% rastvorom varikine u trajanju od 15min. Semena su zatim tri puta isprana sterilnom dejonizovanom vodom, osušena na sterilnom filter papiru i postavljena u petri kutije (30 semena po petri kutiji prečnika 90mm) na osnovnu hranljivu podlogu tj. bazalmedijum (BM) bez dodatih biljnih regulatora rastenja (BRR), u uslovima dugog dana. Osnovna hranljiva podloga korišćena u ovom radu sadržala je saharozu (20g/L), mio-inozitol (100 mg/L; Sigma), agar (6 g/L; Torlak, Beograd), makro i mikrosoli i kompleks gvožđa (Murashige i Skoog 1962; MS, Tabela 1) i vitamine (Linsmaier i Skoog 1965; Tabela 2). pH vrednost hranljive podloge podešavana je na 5,8 pomoću 1N rastvora NaOH neposredno pre sterilizacije.

**Tabela 1.** Sastav mineralnih soli MS u osnovnoj hranljivoj podlozi (Murashige i Skoog, 1962).

MS makro soli	Koncentracija (mg/L)
$NH_4NO_3$	1650
$KNO_3$	1900
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	440
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	370
$KH_2PO_4$	170
MS mikro soli	Koncentracija (mg/L)
$MnSO_4 \times 4H_2O$	22,30
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	8,60
$H_3BO_3$	6,20
$KJ$	0,83
$NaMoO_4 \times 2H_2O$	0,25
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,025
Kompleks gvožđa	Koncentracija (mg/L)
$FeSO_4 \times 7H_2O$	27,85
$Na_2EDTA \times 2H_2O$	37,20

**Tabela 2.** Sastav rastvora vitamina u osnovnoj hranljivoj podlozi (Linsmaier i Skoog, 1965).

Vitamini	Koncentracija (mg/L)
vitamin B1	1,0
vitamin B6	0,5
nikotinska kiselina	0,5
glicin	0,2

Nakon 15 dana, isključala semena su prebrojana i pojedinačni klijanci su prebačeni na svež BM (30 klijanca po petri kutiji). Klijanci su gajeni naredne 3 nedelje u istim uslovima u kojima su isključavani.

### **3.2.2. Multiplikacija izdanaka *in vitro***

Apikalni odsečki izdanaka razvijenih biljaka sa normalnim fenotipom su postavljeni u staklenim teglicama od 100 mL na 40 mL hranljive podloge za umnožavanje koja je sadržala BM obogaćen 6-benzilaminopurinom (BAP, eng. *6-Benzylaminopurine*) u koncentracijama 0; 0,1; 0,2; 0,5 i 1 mg/L. Postavljeno je ukupno 72 odsečka (6 odsečaka po teglici). Na ovoj podlozi biljke su gajene 4 nedelje u uslovima dugog dana, a zatim je izvršena evaluacija morfoloških karakteristika merenjem dužine glavnog izdanka i broja novih izdanaka. Indeks multiplikacije je procenjen kao prosečan broj novih izdanaka po pojedinačnoj biljci.

### **3.2.3. Ožiljavanje izdanaka *in vitro***

Nakon umnožavanja izdanci (n=72) su preneti na podlogu za ožiljavanje koja je podrazumevala BM sa dodatkom indol-3-buterne kiseline (IBA, eng. *Indole-3-butyric acid*) u dve koncentracije, 0,2 i 0,5 mg/L. Kontrolni izdanci gajeni su na podlozi bez dodatka IBA. Nakon 4 nedelje gajenja biljke su skinute sa ove podloge i korenovi su isprani pod mlazom tekuće vode od ostatka podloge. Određivani su dužina najdužeg korena kao i broj formiranih korenova po biljci. Indeks ožiljavanja je određen kao prosečan broj formiranih korenova po pojedinačnoj biljci.

### **3.2.4. Uspostavljanje kulture korenova *in vitro***

Od izdanaka koji su se spontano tokom multiplikacije ožilili (na podlozi koja nije sadržala BAP) odvojeni su korenovi i inicirana je kultura korenova. Po 400 mg korenova postavljeno je u erlenmajere od 100 mL na tečni BM (bez agara) sa upolovljenim sadržajem

MS mineralnih soli (MS $\frac{1}{2}$ ) idodatkom IBA u koncentracijama 0; 0,1; 0,2; 0,5 i 1 mg/L. Kulture su gajene 4 nedelje na horizontalnom šejkeru pri brzini rotiranja platforme od 90 rpm. Nakon toga korenovi su skidani sa podloge i prosušeni na filter papiru da bi se uklonio višak tečnog medijuma. Radi određivanja prirasta merena je sveža masa korenova a nakon 7 dana sušenja na promajnom mestu pri sobnoj temperaturi merena je i suva masa korenova.

### **3.3. Histološka i histohemijska analiza listova biljaka *T. vulgare* gajenih *in vitro***

Za determinaciju tipova mehaničkih i žlezdanih dlaka i histološku analizu listova biljaka iz kulture *in vitro* korišćene su metode skenirajuće elektronske (SEM) i svetlosne mikroskopije. Za dokazivanje prisustva sekundarnih metabolita u sekretornim ćelijama žlezdanih trihoma listova *T. vulgare* korišćene su različite metode histohemijskih bojenja.

#### **3.3.1. Priprema biljnog materijala za skenirajuću elektronsku mikroskopiju**

Za analizu morfologije lista iz kulture *in vitro* skenirajućom elektronskom mikroskopijom korišćeni su drugi i treći list sa glavnog izdanka. Celi sveži listovi sečeni su skalpelom i postavljeni direktno na nosač aksijalnom ili adaksijalnom površinom okrenutom na gore, po metodi opisanoj u odeljku 3.1.2.1. i posmatrani na SEM (JSM-6390 LV, JEOL, Tokyo, Japan). Listovi su uzeti sa po dve nasumično odabrane biljke iz svake od 5 pojedinačnih teglica.

#### **3.3.2. Priprema biljnog materijala za histološku analizu lista svetlosnom mikroskopijom**

Za histološku analizu svetlosnom mikroskopijom korišćeni su drugi i treći list sa glavnog izdanka biljaka gajenih u uslovima *in vitro*. Listovi su fiksirani u FAA fiksativu (5 mL 40% formaldehida:5 mL sirćetne kiseline:90 mL 70% etanola). Nakon dehidratacije alkoholom (60 min u 70%, 15 min u 95%, 30 min u 95% i 15 min u 100% etanolu) i prosvetljavanja ksilolom izvršena je impregnacija materijala parafinom na 58°C. Košanjem mikrotoma

(Reichert, Vienna, Austria), pravljene su poprečni preseki lista debljine 8-10  $\mu\text{m}$ . Deparafinizacija preseka vršena je ksilolom, a rehidracija serijom alkohola različite koncentracije (100, 96, 70 i 50%). Preparati su zatim bojeni hematoksilinom, dehidratirani (serijom alkohola i ksilolom) i inkluzirani u Canada balzam. Posmatranje i snimanje je vršeno na svetlosnom foto-mikroskopu.

### **3.3.3. Histoheмиjska analiza žlezdanih trihoma *T. vulgare***

Za dokazivanje prisustva sekundarnih metabolita u sekretornim ćelijama žlezdanih trihoma *T. vulgare* korišćeni su listovi biljaka iz kulture *in vitro*. Drugi i treći listod vrha izdanka su sečeni žiletom na tanke preseke širine do 1 mm koji su zatim podvrgavani histoheмиjskim bojenjima i fiksirani na predmetnu pločicu pomoću glicerola ili destilovane vode. Sveži preparati su nakon toga posmatrani na svetlosnom mikroskopu (Carl Zeiss, Jena, Nemačka). Prisustvo ukupnih lipida, neutralnih i kiselih lipida, terpena, fenola, tanina, polisaharida, pektina i alkaloida dokazivano je odgovarajućim histoheмиjskim reakcijama.

**Ukupni lipidi** su dokazivani Sudan IV, Sudan Black B i hematoksilen-Sudan Red 7B bojenjem (Jensen, 1962). Sveži preseki su potapani u 50% rastvor etanola, a zatim i u rastvor Sudan IV ili rastvor Sudan Black B. Nakon 20min inkubacije na sobnoj temperaturi, u mraku, kratko su ispirani u 50% etanolu. Kontrolni preseki su potapani u rastvor metanola, hloroforma, vode i hlorovodonične kiseline u odnosu 66:33:4:1, tokom 3h na sobnoj temperaturi, u mraku, da bi se oslobodili lipida a zatim dalje tretirani kao i obojeni preseki.

Za dokazivanje **neutralnih i kiselih lipida** korišćena je Nil Blue A metoda opisana od strane Cain-a (1947). Sveži preseki su potapani u 1% vodeni rastvor Nil Blue, tokom 5-10 min, na temperaturi od 60°C. Nakon boje preseki su na istoj temperaturi potapani u 1% rastvor sirćetne kiseline a zatim ispirani destilovanom vodom. Kontrolni preseki su potapani u 10%rastvor sirćetne kiseline tokom 3h, na sobnoj temperaturi i dalje tretirani kao obojeni preseki.



**Terpeni** u sekretornim ćelijama su dokazivani pomoću Nadi reagensa (David i Carde, 1964). Preseci su potapani u sveže pripremljeni Nadi reagens tokom 1 h, na sobnoj temperaturi u mraku a zatim ispirani u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,2 tokom 2 min. Kontrolni preseci su potapani u 10% rastvor sirćetne kiseline, tokom 3 h, na sobnoj temperaturi u mraku i dalje tretirani kao i obojeni preseci.

Za dokazivanje **fenolnih jedinjenja** korišćen je ferihlorid ( $\text{FeCl}_3$ ) po metodi opisanoj od strane Gahan-a (1984). Preseci su potapani u sveži 2% rastvor  $\text{FeCl}_3$  u 95% etanolu, tokom 5 min na sobnoj temperaturi a zatim ispirani prvo 95% etanolom a zatim i vodom. Kontrolni preseci su potapani u 95% etanol i u vodu tokom 5min, na sobnoj temperaturi.

Prisustvo polifenolnih jedinjenja **tanina i lignina** dokazivano je toluidin plavim po metodi Baker (1966). U reakciji sa toluidin plavim O sveži preseci su potapani u 0.05% rastvor toluidin plavog tokom 2-4 min, na sobnoj temperaturi a zatim kratko ispirani u vodi. Kontrolni preseci su potapani u destilovanu vodu tokom 5min, na sobnoj temperaturi a potom posmatrani pod svetlosnim mikroskopom.

**Polisaharidi** su dokazivani PAS reakcijom (eng. *Periodic Acid Schiff*) po metodi Jensen-a (1962). Preseci su kratko potapani u 2% rastvor natrijum-metabisulfata, tokom 1-2 min dok rastvor ne pobeli a zatim ispirani tekućom vodom 10 min. Nakon toga preseci su tretirani 0,5% perjodnom kiselinom 10 min, ispirani destilovanom vodom a zatim postavljeni u Šifov (eng. *Schiff*) reagens tokom 20-30min, u mraku. Preseci su nakon toga ispirani u tekućoj vodi dok ne pocrvene. Kontrolni preseci su sprovedeni kroz isti protokol za bojenje ali se izostavlja tretman perjodnom kiselinom.

Za dokazivanje **pektina** korišćena je boja Ruthenium Red po metodi Johansen-a (1940). Preseci su potapani u sveži 0,02% vodeni rastvor boje, tokom 5-10 min dok ne pocrvene a zatim kratko ispirani destilovanom vodom.

**Alkaloidi** u sekretornim ćelijama su dokazivani pomoću Lugol, Wagner, Dragendorf i Ellram reagenasa. U testu sa Lugolovim reagensom (Brechu-Franco i sar., 2016) preseci su potapani u ovaj reagens 5 min na sobnoj temperaturi a zatim su kratko ispirani destilovanom vodom. U testu sa Wagner reagensom (Furr i Mahlberg, 1981) preseci su potapani u ovaj

reagens 5 min a potom ispirani vodom. U testu sa Dragendorf reagensom (Svendsen i Verpoorte, 1983) preseći su potapani u reagens 5 min a zatim ispirani 5% vodenim rastvorom natrijum-nitrita. U testu sa Ellram reagensom (Furr i Mahlberg, 1981) preseći su potapani u reagens 5 min na sobnoj temperaturi a zatim prosušeni na vazduhu. Kontrolni preseći u sva tri testa su tretirani 5% rastvorom tartarične kiseline tokom 24h a zatim su ispirani vodom i dalje tretirani odgovarajućim reagensom.

Sveži preseći listova analizirani su i pomoću svetlosnog fluorescentnog mikroskopa u cilju ispitivanja autofluorescencije sekundarnih metabolita.

### **3.4. Izolovanje i hemijska analiza etarskog ulja i metanolnih ekstrakata**

Etarsko ulje (EU) je izolovano iz nadzemnih delova biljaka (herbe) *T. vulgare* koje su sakupljene u prirodi. Metanolni ekstrakti (ME) su pripremani ekstrakcijom listova, cvetova, stabljike i korena biljaka kako bi se uočile razlike u njihovom hemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti. Zbog uporedne analize, paralelno su pripremani i metanolni ekstrakti biljaka gajenih u uslovima *in vitro*. Urađena je uporedna hemijska analiza etarskog ulja i metanolnih ekstrakata biljka iz prirode kao i biljaka koje su gajene u uslovima *in vitro*.

#### **3.4.1. Izolovanje etarskog ulja**

Etarsko ulje je izolovano metodom hidrodestilacije pomoću aparature po *Clavenger-u* (Ljaljević-Grbić i sar., 2008). Za dobijanje etarskog ulja korišćeni suosušeni nadzemni delovi biljaka sakupljenih u fazi cvetanja početne sveže mase 4400 g. Iz 2400 g suvog biljnog materijala, izolovano je etarsko ulje, koje je potom čuvano u tamnim staklenim bočicama na 4°C do dalje hemijske analize. Prinos etarskog ulja je izražen preko zapreminskih procenata (%) tj. v/w, obračunato u odnosu na 100 g suvog biljnog materijala.

Etarsko ulje *in vitro* biljaka izolovano je destilacijom uz pomoću vodene pare po *Clevenger-u*.

Samleveni, suvi materijal, sipan je u balon od 100 ml, a zatim je dodato oko 50 ml destilovane vode. Smeša je zagrevana do ključanja i potom destilovana tokom dva sata. Nakon završetka destilacije, etarsko ulje je isprano sa heksanom i čuvano u frižideru.

### **3.4.2. Analiza etarskog ulja gasnom hromatografijom sa plameno jonizacionim detektorom (GC/FID) i gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (GC/MS)**

Kvantitativna i kvalitativna analiza komponenti etarskog ulja urađena je gasnohromatografski uz korišćenje dva tipa detektora. GC/FID (eng. *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*) analiza urađena je na Agilent 780A gasnom hromatografu (Agilent Technologies, Wilmington, DE, SAD), koji je opremljen sa „split-splitless“ injektorom i automatskim semplerom tečnih uzoraka (ALS; eng. *Automatic Liquid Sampler*) povezanim sa HP-5 kolonom (dužine 30 m, poprečnog preseka 0.32 mm i debljine filma 0.25  $\mu\text{m}$ ) i plameno jonizacionim detektorom (FID). Vodonik je korišćen kao noseći gas a brzina protoka je bila 1 mL/min. Temperatura injektora iznosila je 250°C, detektora 300°C, dok je temperatura kolone rasla u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40-260°C (u intervalima od 4°C u minuti), a zatim održavana izotermalno na 260°C tokom narednih 10 minuta. Rastvori etarskog ulja u etanolu (~1%) su redom injektirani u zapremini od 1  $\mu\text{l}$  u „splitless“ režimu rada inleta. Kao osnova za kvantifikaciju podataka uzeti su procenti površina ispod pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC/FID).

Za GC/MS (eng. *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) analizu rađenu na HPG 1800C Series II GCD analitičkom sistemu (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, SAD), korišćene su slične analitičke metode i uslovi, s tom razlikom što je korišćena HP-5MS kolona (dužine 30 m, poprečnog preseka 0.25 mm i 0.25  $\mu\text{m}$  debljine filma) a kao noseći gas korišćen je helijum. Temperatura transfer linije je bila 260°C a maseni spektri su snimani u EI režimu (70 eV) u  $m/z$  opsegu 40-450. Etanolni, 1%, rastvori etarskih ulja su redom injektirani u zapremini od 1  $\mu\text{l}$  u „splitless“ režimu rada inleta.

Pojedinačne komponente etarskog ulja su identifikovane poređenjem njihovih masenih spektara sa masenim spektrima iz Wiley 275 i NIST/NBS baza. Eksperimentalne vrednosti za retencione indekse su dobijene korišćenjem kalibrisanog AMDIS (eng. *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*) softvera (AMDIS ver.2.1. National Institute of Standards and Technology - NIST, Standard Reference Data Program Gaithersburg, MD, SAD) i poređenjem sa dostupnim literaturnim podacima (Adams, 2007).

Rezultati GC/MS analize prikazani su karakterističnim hromatogramima, sa identifikovanim jedinjenjima. Normalizovanjem hromatograma tj. uvođenjem koncentracionog indeksa (CI) i relativnog retencionog vremena (RRT) dobijeni su relativni udeli ostalih komponenti u odnosu na odabranu referentnu komponentu. Koncentracioni indeks je merilo relativne zastupljenosti neke komponente u uzorku pri čemu se najzastupljenijoj komponenti dodeli vrednost  $CI=1000$ . Zastupljenost ostalih komponenti je određivana preko formule  $CI=1000 \times (\%m/m) / (\%m/m \text{ najzastupljenije komponente})$ .

Gasnohromatografsko-masenospektrometrijska (GC/MS) analiza etarskog ulja *in vitro* biljaka je urađena na GC sistemu Agilent Technologies 7890 A opremljenom sa 5975 C Inert MSD i plameno-jonizacionim (FID) detektorima. Uređaj je opremljen *split-splitless* injektorom i kapilarnom kolonom sa HP-5MS stacionarnom fazom, dimenzija 30 m x 0,25 mm i debljine filma 0,25  $\mu\text{m}$ . Nosilac je helijum (3 mL/min). Energija jonizujućih elektrona iznosi 70 eV. Početna temperatura kolone je 60 °C, a zatim se kolona zagreva do 300 °C (temperaturni gradijent iznosi 3 °C/min). Na 300 °C temperatura se održava 10 minuta. Temperature injektora i jonskog izvora iznosile su 250 °C, odnosno 230 °C, dok je temperatura kvadrupola 150 °C.

### 3.4.3. Priprema metanolnih ekstrakata

Za pripremu metanolnih ekstrakata cveta, lista, stabljike i korena biljaka iz prirode korišćeno je po 30 g osušenog biljnog materijala, zasebno usitnjenog u blenderu do finog praha. Ekstrakcija je započeta dodavanjem 300mL metanola i sonifikacijom u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 20 min. Ekstrakcija je nastavljena maceracijom tkiva u

mraku, na sobnoj temperaturi u trajanju od 48 sati. Ekstrakti su zatim profiltrirani kroz filter papir (Whatman No. 4), i upareni do suva na 40°C pomoću rotacionog vakuum uparivača (Buchi R-210, Flawil, Švajcarska) i sušeni na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Tako dobijeni suvi ekstrakti lista, stabljike, cveta i korena su čuvani u zatvorenim tamnim staklenim bočicama na sobnoj temperaturi do hemijske analize.

Za pripremu metanolnih ekstrakata herbe i korena biljaka iz prirode ili gajenih *in vitro*, 500 mg suvog biljnog materijala je usitnjeno u blenderu do sitnog praha. Usitnjeni materijal je zatim ekstrahovan u 10 ml metanola u ultrazvučnom kupatilu tokom 20 minuta. Ekstrakcija je nastavljena maceracijom na sobnoj temperaturi u mraku tokom 48 sati. Ekstrakti su potom profiltrirani u normalne sudove i dopunjeni metanolom do zapremine od 10 ml. Tako dobijeni ekstrakti su dalje analizirani HPLC metodom.

#### **3.4.4. Analiza metanolnih ekstrakta tečnom hromatografijom direktno povezanom sa masenom spektrometrijom (LC/MS) i visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom (HPLC)**

Hemijska analiza metanolnih ekstrakata lista, cveta, stabljike i korena biljaka *T. vulgare* iz prirode urađena je na tečnom hromatografu (LC; eng. *Liquid Chromatography*) sa UV-diodnim detektorom (UV-DAD; eng. *UV-Diode Array Detector*) na aparatu Agilent 1200 Series HPLC-DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemačka) povezanim sa masenim spektrometrom (MS; eng. *Mass Spectrometry*) sa elektro-sprej jonskim izvorom i analizatorom vremena preleta (ESI ToF 6210; Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD). Za hromatografsko razdvajanje je korišćena nepolarna reverznofazna kolona Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 µm, 4.6 mm × 150 mm, Agilent Technologies) uz primenu smeše rastvarača, 0.2% mravlja kiselina (rastvarač A) i acetonitril (rastvarač B). Spiranje analita sa kolone je urađeno je po sledećem gradijentnom programu: 0-30 min 10-25% B, 30-40 min, 25-55% B, 40-50 min, 55-100% B, 50-55 min, 100% B, 55-56 min, 100-10% B, 56-61 min, 10% B. Injektovano je 2 µl ekstrakta rastvorenog u metanolu (c = 10 mg/ml), a kolona je termostatirana na 40 °C pri protoku od 0.8 ml/min. UV DAD spektri su prikupljeni u opsegu od 190-650 nm dok su hromatogrami prikazani na talasnoj dužini

od 280 nm. Maseni spektri su snimljeni u rasponu od 100 do 2500  $m/z$  vrednosti. Kao gas za sušenje korišćen je azot zagrejan na 350°C pri pritisku od 45 psi i protoku od 12 l/min. Uslovi za snimanje na spektrometru su: jonizacija u negativnom modu, napon na kapilari 4000 V, napon na fragmentoru 70 V i napon na skidaču (skimmer) 60V. Eluirane komponente su detektovane kao  $[M-H]^-$ ,  $[M+HCO_2]^-$ ,  $[2M-H]^-$  ili  $[M-2H]^{2-}$  joni koristeći navedene parametre. Za snimanje i obradu dobijenih podataka korišćen je MassHunter Workstation program (Agilent Technologies). Retenciono vreme detektovano na DAD detektoru, UV i maseni spektri su korišćeni za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju komponenti ispranih sa kolone.

Hemijska analiza komponenti metanolnih ekstrakata herbe i korena biljaka iz prirode i gajenih *in vitro* rađena je visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom (HPLC) na aparatu Agilent1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemačka), na koloni Zorbax SB-C18 (5  $\mu$ m), 150 x 4,6 mm, sa DAD detektorom. Kao mobilna faza korišćena je 1% ortofosforna kiselina (A) i acetonitril (B), protok je iznosio 0,8 ml/min. Injekciona zapremina uzorka je bila 10  $\mu$ l a eluiranje je gradijentno po sledećoj šemi: 90 -75% A, 0-30 min, 75-45% A, 30-40 min, 45-0% A, 40-50 min. UV apsorbcija je merena na 280 i 360 nm.

### **3.5. Određivanje sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnog potencijala metanolnih ekstrakata**

Pošto je HPLC metodom utvrđeno da su metanolni ekstrakti herbe i korena biljaka gajenih *in vitro* znatno siromašniji po hemijskom sastavu i relativnoj količini biološki aktivnih jedinjenja svi dalji testovi ispitivani su na etarskom ulju i/ili metanolnim ekstraktima biljaka iz prirode.

Sadržaj ukupnih fenola kao i antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata cveta, lista, stabljike i korena *T. vulgare* određivane su spektrofotometrijski: DPPH testom i testom redukujućeg potencijala.

### 3.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima lista, stabljike, cveta i korena *T. vulgare* određen je spektrofotometrijski korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa po metodi Singleton i Rossi (1965), sa izvesnim modifikacijama. Metoda se zasniva na oksidaciji fenolnih jedinjenja pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Ovaj reagens je smeša fosfovolframove ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) i fosfomolibdeske kiseline ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) koja nakon oksidacije fenolnih jedinjenja redukuje u plavo okside volframa i molibdena (fenol- $MoW_{11}O_{40}$ )<sup>-4</sup>. Dobijeni plavi rastvor ima maksimum apsorpcije na 765 nm pri čemu je apsorpcija proporcionalna sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorku. Količina fenolnih jedinjenja u uzorku se određuje pomoću kalibracione krive dobijene iz serije razblaženja galne kiseline po gramu suve biljne mase (mgGAE/gFW).

U 100  $\mu$ L ekstrakta koncentracije 0.5 mg/mL dodato je 500  $\mu$ L 10 puta razblaženog Folin-Ciocalteu reagensa (Sigma–Aldrich, Steinheim, Nemačka). Nakon 5 minuta, u rastvor je dodato 400  $\mu$ L 0,07 M natrijum karbonata ( $Na_2CO_3$ ) a zatim je sledilo inkubiranje u trajanju od 2 sata u mraku, na sobnoj temperaturi. Apsorbanca uzoraka je merena na Agilent 8453 UV-Visible spektrofotometru (Life Science, SAD) u tri ponavljanja po uzorku. Za konstruisanje kalibracione krive korišćena je galna kiselina rastvorena u destilovanoj vodi u koncentracijama 0,01 – 0,1 mg/mL. Rezultati su izraženi kao miligram ekvivalenti galne kiseline po gramu suve mase ekstrakta (mgGAE/gFW).

### 3.5.2. Određivanje antioksidativnog potencijala metanolnih ekstrakata DPPH testom

Relativna antiradikalska aktivnost metanolnih ekstrakata određena je DPPH testom po metodi Brand-Williams i sar. (1995) sa izvesnim modifikacijama. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) je stabilna slobodno-radikalska forma, čiji je metanolni rastvor ljubičaste bojesa maksimumom apsorpcije na talasnoj dužini od 517 nm. Reakcijom antioksidanasa sa DPPH radikalima dolazi do transfera protona, odnosno atoma vodonika sa antioksidansa na DPPH. U ovoj reakciji se stabilni DPPH radikali prevode u žuto obojeni 1,1-difenil-2-

(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazini dolazi do smanjenja apsorbance na 517 nm, što ukazuje na antioksidativni potencijal ekstrakata

Antioksidativna aktivnost je ispitivana u metanolnim ekstraktima koncentracije 0,06; 0,12; 0,25; 0,5 i 1,0 mg/mL. Reakciona smeša se sastojala od 500  $\mu$ L uzorka i 500  $\mu$ L 150  $\mu$ M metanolnog rastvora DPPH. Dobijena smeša (1 mL) je inkubirana na sobnoj temperaturi u mraku tokom 20 minuta. Nakon toga, merena je apsorbancaredukovanih DPPH radikalana 517 nm. Za svaku koncentraciju pojedinačnih metanolnih ekstrakata *T. vulgare* urađeno je tri merenja. Kao pozitivna kontrola korišćen je Trolox, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina koja je sintetički analog vitamina E (Sigma–Aldrich, Steinheim, Nemačka).

Antioksidativni kapacitet analiziranih uzoraka je određen prema formuli:

$$\% \text{ Inhibicije} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

gde je  $A_0$ -apsorbanca metanolnog rastvora DPPH a  $A_1$ -apsorbanca smeše metanolnog rastvora DPPH i ispitivanog uzorka.

Rezultati su predstavljeni kao  $IC_{50}$  vrednosti dobijene linearnom regresijom. Ova vrednost predstavlja koncentraciju uzorka ( $\mu$ g/ml) odnosno metanolnih ekstrakata *T. vulgare* koji su potrebni za neutralizaciju 50% DPPH radikala.

### 3.5.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti testom redukujućeg potencijala

Redukujući potencijal ispitivanih metanolnih ekstrakata određen je spektrofotometrijski, metodom opisanom od strane Xue i sar. (2011). Ovaj test je često korišćen za procenu sposobnosti antioksidanta da donira elektron tj. da bude reduktant. U testu redukujuće aktivnosti dolazi do transformacije feri ( $Fe^{3+}$ ) jona u fero ( $Fe^{2+}$ ) jon koja ukazuje na sposobnost bioaktivnih jedinjenja tj. antioksidanata da doniraju elektron. Prisustvo antioksidanasa u analiziranom ekstraktu uzrokuje redukciju  $Fe^{3+}$ /fericijanid kompleksa u fero formu a ta redukcija dovodi do formiranja prusko plavog kompleksa. Apsorbanca



prusko plavog na 700 nm odgovara koncentracijifero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) jona. Povećanje apsorbance ukazuje na povećanje redukujućeg potencijala.

Redukcioni potencijal metanolnih ekstrakata *T. vulgare* meren je u reakcionim smešama koje su sadržavale ekstrakte (0,1-1 mg/mL) rastvorene u 0,2 mM fosfatnom puferu pH 7 uz dodatak kalijum fericianida ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) (Sigma–Aldrich, Steinheim, Nemačka) u koncentraciji 10 mg/mL. Dobijena smeša je inkubirana na 50°C tokom 20 minuta. Nakon toga u smešu je dodavana trihlorsirćetna kiselina (Serva, Heidelberg, Nemačka) u koncentraciji 100 mg/mL, a zatim je smeša centrifugirana na 2000×g tokom 10 min. Izdvojeni supernatant je zatim pomešan sa gvožđe (III) hloridom koncentracije 1 mg/mL (Merck, Darmstadt, Nemačka) i ostavljen na sobnoj temperaturi 10 min tokom kojih nastaje plavo obojeno redukovano jedinjenje, čija je apsorbance zatim merena na 700 nm. Kao pozitivna kontrola korišćen je Trolox u seriji razblaženja (0,1-1 mg/mL). Svako merenje je urađeno u tri ponavljanja.

### **3.6. Ispitivanje bioloških aktivnosti etarskog ulja i metanolnih ekstrakata**

U ovom radu testiran je i biološki potencijal etarskog ulja i metanolnih ekstrakata lista, cveta, stabljike i korena *T. vulgare* iz prirode. Ispitivana je njihova antimikrobna aktivnostna odabrane patogene vrste bakterija i gljiva kao i citotoksična aktivnost na tumorske ćelije grlića materice. Pored toga praćeno je i potencijalno negativno dejstvo etarskog ulja *T. vulgare* na larve gubara kao jednog od najvećih štetočina prisutnih u našim krajevima. Na biljkama krompira (*Solanum tuberosum* L.) gajenim *in vitro* ispitivan je potencijal etarskog ulja da indukuje ekspresiju gena koji učestvuju u odbrambenom odgovoru biljaka na herbivore i patogene.

#### **3.6.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja i metanolnih ekstrakata *T. vulgare***

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja i metanolnih ekstrakata *T. vulgare*, korišćena je modifikovana mikrodiluciona metoda (Espinell-Ingroff, 2001; EUCAST 2002)

sa ciljem određivanja minimalnih inhibitornih (MIK) i minimalnih baktericidnih/fungicidnih koncentracija (MBK/MFK).

### 3.6.1.1. Vrste mikroorganizama

U radu su korišćene odabrane vrste bakterija i mikromiceta deponovanih u Laboratoriji za mikologiju, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu (Tabela 3).

**Tabela 3.** Vrste bakterija i mikromiceta korišćene za ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja i metanolnih ekstrakata *T. vulgare*.

Gram (-) bakterije	Gram (+) bakterije
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35210)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Bacillus cereus</i> (klinički izolat)
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 13311)	<i>Micrococcus flavus</i> (ATCC 10240)
<i>Enterobacter cloacae</i> (ATCC 35030)	<i>Listeria monocytogenes</i> (NCTC 7973)
Mikromicete	
<i>Aspergillus fumigatus</i> (1022)	
<i>Aspergillus ochraceus</i> (ATCC 12066)	
<i>Aspergillus versicolor</i> (ATCC 11730)	
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 6275)	
<i>Penicillium funiculosum</i> (ATCC 36839)	
<i>Penicillium ochrochloron</i> (ATCC 9112)	
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (izolat iz hrane)	
<i>Trichoderma viride</i> (IAM 5061)	

Analizirane kulture održavane su na sterilnim čvrstim hranljivim podlogama i to Müller-Hinton agar (Torlak, Beograd, Srbija) za bakterije i MA (eng. *Malt agar*, Torlak) za mikromicete. Sve kulture su čuvane na 4°C i presejavane jednom mesečno na sveže podloge (Booth, 1971).

Za potrebe eksperimenata bakterijske kulture su prebacivane na TSB (eng. *Tryptic Soy Broth*, Torlak) podlogu a mikromicetena SDB (eng. *Sabouran Dextrose Broth*) podlogu i držane tokom 24h na 37°C u mraku. Nakon inkubacije napravljene su ćelijske suspenzije kultura, čija je koncentracija podešena korišćenjem denzitometra DEN1B (Biosan, Litvanija). Kao inokulum za mikrodilucionu metodu korišćene su suspenzije koncentracije  $1 \times 10^5$  CFU/mL. Inokulumi su čuvani na +4°C do upotrebe. Kao provera validnosti inokuluma i odsustva kontaminacije vršena je inokulacija suspenzija bakterija na Müller-Hinton agar i mikromiceta na MA pologu.

### **3.6.1.2. Mikrodiluciona metoda**

Mikrodilucionom metodom su MIK, MBK/MFK određivane nanošenjem serijskih razblaženja EU ili metanolnih ekstrakata (u 5% DMSO) u 100 µL TSB/SDB hranljive podloge u mikrotitar pločama sa ravnim dnom (Spektar, Čačak, Srbija). Nakon dodavanja po 10 µL inokuluma analiziranih sojeva bakterija ili mikromiceta, mikrotitar ploče su inkubirane tokom 24 h na temperaturi od 37°C za bakterije, odnosno na 28°C tokom 72 sata za mikromicete. Posmatranjem pod binokularnim mikroskopom određivane su MIK, koje su predstavljale najniže koncentracije na kojima nije bilo vidljivog rasta bakterija i gljiva. U cilju lakše vizualizacije rezultata u bunariće je dodato po 40 µL p-jodonitrotetrazolijum (INT, Sigma, SAD) boje (Tsukatani, 2012), koja ćedati intenzivno ljubičastu boju u bunarićima u kojima je intenzivan rast bakterija dok su mesta na mikrotitar ploči sa bleđom ljubičastom bojom rezultat inhibitornog dejstva ekstrakta ili ulja (CLSI, 2009; Tsukatani i sar. 2012).

Minimalne MBK i MFK su određivane serijom reinokulacija po 10 µL bakterijskog, odnosno 2 µL inokuluma gljiva sa mesta gde nije bio uočen rast mikroorganizama, u

bunariće sa novih 100 µL TSB/MA hranljive podloge. Kulture su inkubirane pod istim uslovima kao i prilikom prve inokulacije (24h na temperaturi od 37°C za bakterije, odnosno na 28°C tokom 72 sata za gljive). MBK/MFK je definisana kao koncentracija etarskog ulja ili metanolnih ekstrakata koja je u potpunosti zaustavila rast mikroorganizama ili je dovela do smrti 99.5% bakterija/gljivau odnosu na kontrolnu grupukoja je rasla pod istim uslovima ali bez dodatka metanolnih ekstrakata ili ulja (CLSI, 2009; Espinel-Ingroff, 2001).

Kao pozitivne kontrole korišćeni su rastvori komercijalnih antibiotika *Streptomycin* (Polfa, Tarchomin, Poljska) i *Ampicilin* (Panfarma, Beograd, Srbija) koji sadrže 1 mL aktivne supstance u 1 mL 5% DMSO, ili antimikotika *Bifonazol losion* (Srbolek, Beograd, Srbija) koji sadrži 1g aktivne supstance u 100 mL etanola uz dodatak solubizatora i glicerolai *Ketokonazol* (Zorka farma, Šabac, Srbija) koji sadrži 200 mg aktivne supstance u 200 mL 5% DMSO. Kao negativna kontrola u svim eksperimentima korišćen je 5% DMSO.

Svaka koncentracija etarskog ulja/metanolnih ekstrakata je testirana u triplikatu za svaku ćelijsku liniju.

### **3.6.2. Ispitivanje citotoksične aktivnosti**

Za ispitivanje citotoksične aktivnosti etarskog ulja i metanolnih ekstrakata *T. vulgare* u uslovima *in vitro* korišćen je kolorimetrijski sulforodamin B test (SRB test; Perez i sar., 1993; Papazisis i sar., 1997). Citotoksična aktivnost je ispitivana na humanim tumorskim ćelijama grlića materice (HeLa ćelije) i na humanim netumorskim fetalnim plućnim fibroblastima (MRC-5 ćelije), korišćenim kao kontrola. Morfološke promene na HeLa i MRC-5 ćelijama nakon 72 h kontinualnog delovanja metanolnih ekstrakata ili etarskog ulja analizirane su pod svetlosnim mikroskopom.

#### **3.6.2.1. Kulture ćelijskih linija**

HeLa i MRC-5 ćelijske linije su održavane na RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 hranljivoj podlozi (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka). Ova hranljiva podloga je obogaćena sa 10% fetalnog telećeg seruma (FCS; eng. *Fetal Calf Serum*) prethodno

inaktivisanog toplotom, 25 mM 4-(2-hidroksietil) piperazin-1-etansulfonskom kiselinom (HEPES, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka), penicilinom (100 U/mL), streptomycinom (200 µg/mL, Polfa, Tarchomin, Poljska) i 3 mM L-glutaminom (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka). Čelijske linije su održavane kao monoslojne u bocama za kulturu tkiva (Thermo Scientific Nunc™), u inkubatoru na temperaturi od 37°C, u vazduhu zasićenom vodenom parom i 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.6.2.2. SRB test**

Tokom utvrđivanja citotoksičnog delovanja etarskog ulja i metanolnih ekstrakata *T. vulgare* SRB testom, čelijske linije su zasejane u bunariće na mikrotitar ploči (Thermo Scientific Nunc™) u 100 µL hranljive podloge. HeLa čelijske linije su zasejavane u gustini od  $4,0 \times 10^3$  ćelija/bunariću dok su MRC-5 čelijske linije zasejavane u gustini od  $7,0 \times 10^3$  ćelija/bunariću. Nakon 24 h rasta ćelije su izlagane seriji razblaženja metanolnih ekstrakata/ulja zapremine 50 µL dok su kontrolni bunarići sadržali samo hranljivi medijum sa zasejanim čelijskim linijama. Serijska razblaženja su pripremana u hranljivom medijumu tako da finalna koncentracija etanola u bunariću bude manja od 0,1% (v/v). Komercijalni citostatik CDDP (cis-diamindihloroplatina(II), cisplatin; Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka) je korišćen kao pozitivna kontrola. Svaka koncentracija metanolnih ekstrakata/ulja je testirana u triplikatu za svaku čelijsku liniju.

Ćelije u bunarićima mikrotitar ploča su fiksirane sa 50 µL hladne (4°C) 10% trihlorsirćetne kiseline (Serva, Heidelberg, Nemačka). Nakon toga mikrotitar ploče su pet puta ispirane sa dejonizovanom vodom i sušene na sobnoj temperaturi tokom 24 sata. Zatim je u svaki bunarić dodato 50 µL SRB rastvora (0.4% (w/v) u 1% (v/v) sirćetnoj kiselini) i ostavljeno da deluje tokom 20 minuta. SRB rastvor je zatim uklonjen ispiranjem pet puta sa 1% sirćetnom kiselinom a onda su ploče osušene na vazduhu. Vezani SRB je rastvoren u 200 µl po bunariću 10 mM rastvorom tris (hidroksimetil) aminometanom (TRIS, Serva, Heidelberg, Nemačka) i ekstrahovan iz ćelija. Apsorbanca dobijenog rastvora je merena na talasnoj dužini od 570 nm na fotometru (Thermo Labsystems Multiskan EX 200-240 V).

Citotoksični potencijal metanolnih ekstrakata/etarskog ulja je izražen kao IC<sub>50</sub> vrednost, tj. kao koncentracija EU/ME pri kojoj inhibicija rasta ćelija iznosi 50%, a koja je određena preko dijagrama preživljavanja ćelija.

### **3.6.2.3. Morfološka analiza citotoksičnog delovanja primenom svetlosne mikroskopije**

Ćelijske linije HeLa (5 x 10<sup>4</sup> ćelija/bunariću) i MRC-5 (1 x 10<sup>5</sup> ćelija/bunariću) su zasejane u 6 bunarića mikrotitar ploče, u po 2 mL hranljive podloge. Nakon 24 sata rasta, ćelije su izložene dejstvu metanolnih ekstrakata lista i cveta pri koncentraciji od 50 µg/mL. Ova dva ekstrakta su u prethodnom ispitivanju pokazala citotoksičnu aktivnost u mikrogramskom opsegu koncentracija te su zbog toga dalje korišćena u ispitivanju morfoloških promena na obe ćelijske linije. CDDP u koncentraciji od 1,73 µg/mL je korišćen kao pozitivna kontrola. Netretirane HeLa i MRC-5 ćelijske linije su korišćene kao kontrola. Nakon tretmana od 72 sata, ćelije su posmatrane pod svetlosnim mikroskopom i fotografisane Olympus digitalnom kamerom povezanom sa mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Nemačka, objektiv 6.3/0.20).

### **3.6.3. Ispitivanje efekta etarskog ulja na gusenice gubara (*Lymantria dispar* L.)**

U cilju ispitivanja potencijalnog negativnog delovanja etarskog ulja *T. vulgare* na neke od glavnih insekata štetočina prisutnih u našim krajevima, odabran je gubar (*Lymantria dispar* L.). Larve ove štetočine izlagane su direktnom delovanju etarskog ulja radi ispitivanja uticaja rezidualne kontaktne toksičnosti na mortalitet larvi ali i indirektnom delovanju etarskog ulja unetim kroz hranu, kojim se izaziva digestivna toksičnost koja može uticati na performanse rastenja i razvića larvi.

#### **3.6.3.1. Gajenje larvi gubara u laboratorijskim uslovima**

Jajna legla gubara sakupljana su u Lipovičkoj šumi tokom tri jeseni, od 2011. do 2013. godine a do početka eksperimenata čuvana su na temperaturi od 4°C. Jaja su površinski

dezinfikovana potapanjem u 0,1 % rastvor natrijum-hipohlorita u trajanju od 5 minuta. Nakon toga su 10 minuta ispirana destilovanom vodom i na kraju osušena na sobnoj temperaturi. Iniciranje piljenja u laboratorijskim uslovima vršeno je u klima komori na temperaturi od 25°C. Do trećeg larvenog stupnja gusenice gubara su gajene grupno, po deset individua u jednoj petri posudi dimenzija 90 x 14 mm. Od trećeg stupnja gusenice su gajene pojedinačno. Svakog dana gusenice su hranjene veštačkom hranom (HWG dijeta – engl. *High Wheatgerm Diet*). Veštačka hrana (Slika 3.1.), korišćena za gajenje gusenica gubara i testove digestivne toksičnosti pravljena je po recepturi prikazanoj u Tabeli 4.



**Slika 3.1.** Veštačka hrana za ishranu gusenica gubara

**Tabela 4.** Sastav veštačke HWG hranljive podloge korišćene za gajenje gusenica gubara

	100 ml
Pšenične klice	12 g
Kazein	2,5 g
Mešavina soli po Wesson-u	0,8 g
Sorbinska kiselina	1,2 g
Mešavina vitamina po Vanderzant-u	1g
Agar	1,5 g
Destilovana voda	82 ml

Tokom gajenja i u svim eksperimentima petri posude sa gusenicama su držane u klima komorama sa konstantnim uslovima optimalnim za razviće ovih larvi. Svetlosni režim je podrazumevao 15 časova neonske difuzne svetlosti intenziteta 30159 candela i 9 h mraka. Temperatura je sve vreme iznosila  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  uz relativnu vlažnost vazduha od  $65\pm 5\%$ .

### 3.6.3.2. Ispitivanje rezidualne kontaktne toksičnosti etarskog ulja *T. vulgare* na gusenice gubara

U testu za ispitivanje rezidualne toksičnosti etarskog ulja *T. vulgare* na gusenice gubara nadno petri posude nanošeno je 0,5 mL etanolnih rastvora etarskog ulja u koncentracijama: 0,1; 0,5 i 1,0 %. Kao kontrola korišćen je 96 % etanol koji je služio i kao rastvarač etarskog ulja. Nakon isparavanja rastvarača isušavanja depozita u periodu od 30 min na temperaturi  $25^{\circ}\text{C}$ , u svaku petri posudu je unešeno po 10 gusenica gubara drugog stupnja razvića (Slika 3.2.). Posle 24 h gusenice su prebačene u čiste petri posude gde su ostale do kraja eksperimenta i hranjene standardnom veštačkom hranom za gubara (Tabela 4). Nakon 24, 48, 72, 96 i 120 h od postavljanja eksperimenta izvršena je ocena smrtnosti odnosno mortaliteta gusenica. Svaka koncentracija etarskog ulja je testirana u pet ponavljanja (petri kutija).

Uporedo sa praćenjem mortaliteta izazvanog rezidualnom kontaktnom toksičnošću etarskog ulja praćen je i uticaj etarskog ulja na presvlačenje gusenica gubara iz drugog u treći larveni stupanj.



**Slika 3.2.** Stupnjevi razvića gusenica gubara (*Lymantria dispar* L.).



### 3.6.3.3. Ispitivanje digestivne toksičnosti etarskog ulja *T. vulgare* na gusenice gubara drugog stupnja

Ispitivana je toksičnost etarskog ulja *T. vulgare* na komponente digestivnog sistema gusenica gubara. U ovom testu larve gubara su hranjene veštačkom hranom u koju su dodavani 0,1; 0,5 i 1,0% etanolni rastvori etarskog ulja dok je kao kontrola korišćena samoveštačka hrana bez dodatka etarskog ulja. U petri posude je smešteno po 10 gusenica gubara drugogstupnja i gajeno na tretiranoj i kontrolnoj veštačkoj hrani (Slika 3.3). Gusenice su pre početka oglada bile izložene gladovanju tokom 24 h.



**Slika 3.3.** Test digestivne toksičnosti.

Svaka koncentracija etarskog ulja je testirana u pet ponavljanja (petri kutija). U toku trajanja eksperimenta na svaka 24 h gusenicama su dodavane po dve nove kocke veštačke hrane koje su sadržale etarsko ulje, dok su stare kocke veštačke hrane vadene iz petri posuda. Nakon 24, 48, 72, 96 i 120 h od početka testa kontrolisan je mortalitet gusenica. Pored toga, u ovom testu je praćen i uticaj unetog etarskog ulja na presvlačenje gusenica gubara iz drugog u treći larveni stupanj (Slika 3.3).

#### 3.6.3.4. Ispitivanje uticaja etarskog ulja *T. vulgare* na indekse rasta i ishrane gusenica gubara četvrtog stupnja

Gusenice gubara su po prelasku četvrti stupanj razvicia izložene 24-časovnom gladovanju a zatim je izmerana masa svake gusenice pojedinačno. Svaka gusenica je zatim stavljena u posebnu petri posudu u koju je dodata po jedna, prethodno izmerena kocka veštačke hrane, koja je sadržala 0,1; 0,5 ili 1,0% etanolnih rastvora etarskog ulja *T. vulgare*. U kontrolnoj eksperimentalnoj grupi korišćena je veštačka hrana bez dodatog etarskog ulja. Masa živih gusenica, masa preostale hrane, kao i masa ekskremenata merena je nakon 48 h od početka eksperimenta. Po završetku eksperimenta gusenice su prenete u zamrzivač na temperaturu od  $-20^{\circ}\text{C}$ , 24 h. Ostaci hrane i ekskremenata su takođe smešteni u zamrzivač i adekvatno obeleženi. Posle 24 h, svaka zaleđena gusenica je uvijana u aluminijumsku foliju (Slika 3.4.) i sušena u sušnici na temperaturi od  $65^{\circ}\text{C}$ , u trajanju od 72 h.



**Slika 3.4.** Gusenice gubara uvijene u foliju i smeštene u sušnicu.

Tako pripremljeni uzorci su zatim sušeni u sušnici na temperaturi od  $65^{\circ}\text{C}$ , u trajanju od 72 h. Nakon 72 h sušenja ponovo je izmerena masa svake pojedinačne gusenice, ostataka hrane i ekskremenata. Takođe, izmerena je i masa 30 gusenica četvrtog stupnja (24 h od presvlačenja) i 30 kocki veštačke hrane. Odmah nakon merenja, gusenice i kocke veštačke hrane su sušene na temperaturi od  $65^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 72 h. Po isteku ovog vremena, ponovo je izmerena masa svake gusenice i svake kocke veštačke hrane. Tako su dobijeni odnosi između sveže i suve mase gusenica i kocki hrane. Ovi odnosi između sveže i suve mase su korišćeni za računanje suve mase gusenica i kocki hrane na početku testa. Na osnovu ovih

podataka izračunati su indeksi rasta i ishrane, RGR (relativna brzina rasta; eng. *Relative Growth Rate*), RCR (relativna brzina konzumacije hrane; eng. *Relative Consumption Rate*), AD (efikasnost asimilacije; eng. *Approximate Digestibility*), ECD (efikasnost konverzije svarene hrane; eng. *Efficiency of Conversion of Digested food*), ECI (efikasnost konverzije unete hrane; eng. *Efficiency of Conversion of Ingested food*), prema formulama Waldbauer-a (1968).

$$\text{RGR} = (m_t - m_0) / (m_0 \times t) \quad [\text{mg}/(\text{mg} \cdot \text{dan})]$$

$$\text{RCR} = m_c / (m_0 \times t) \quad [\text{mg}/(\text{mg} \cdot \text{dan})]$$

$$\text{AD} = (m_c - m_e) / m_c \times 100 \quad [\%]$$

$$\text{ECD} = (m_t - m_0) / (m_c - m_e) \times 100 \quad [\%]$$

$$\text{ECI} = (m_t - m_0) / m_c \times 100 \quad [\%]$$

$m_c$ -masa konzumirane hrane

$m_e$ -masa ekskrementa

$t$ -trajanje testa izraženo u danima

$m_0$ -masa gusenice na početku testa

$m_t$ -masa gusenice na kraju testa

### **3.7. Ispitivanje potencijala etarskog ulja *T. vulgare* za indukciju odbrambenih mehanizama krompira (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro***

Za ispitivanje potencijala etarskog ulja da indukuje odbrambene mehanizme kod krompira (*Solanum tuberosum* L.) gajenog *in vitro* praćena je ekspresija *PAL1*, *PR-2*, *PR-5* i *Pin2* gena koji učestvuju u odgovorima biljaka na herbivore i patogene. Upravo sa ovim istraživanjima praćeni su i enzimi antioksidativne zaštite krompira, katalaze (CAT), da bi se utvrdio nivo stresa koji je indukovano u biljkama krompira nakon izlaganja etarskom ulju.

### 3.7.1. Priprema biljnog materijala

Za praćenje ekspresije gena koji učestvuju u odbrambenom odgovoru krompira i za analizu aktivnosti enzima antioksidativnog stresa, krompir je gajen u kulturi *in vitro*. Jednododalni segmenti krompira su gajeni nabazalnom medijumu (BM) odnosno MS hranljivoj podlozi (Tabele 1 i 2) sa dodatkom 3% saharoze pripremanoj i sterilisanoj po proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.

Nakon dve nedelje gajenja u kontrolisanim uslovima dugog dana (opisanim u poglavlju 3.2.) u bočice sa krompirom je ubačen sterilni filter papir (Whatman No. 4; 2 cm x 2 cm) natopljen sa 100  $\mu$ L etarskog ulja *T. vulgare* koje je prethodno razblaženo u metanolu 100 puta (v/v). Filter papir sa uljem nije bio u direktnom kontaktu sa biljkama krompira (Slika 3.5).



**Slika 3.5.** Staklena posuda sa krompirom gajenim *in vitro* i izloženim dejstvu etarskog ulja *T. vulgare* natopljenog na filter papir.

Nakon 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 i 72 h po izlaganju etarskom ulju nadzemni delovi biljakakrompira su trenutno zamrzavani u tečnom azotu i materijal je čuvanna -80°C do analize. Sa ciljem da se ispita i eventualni uticaj metanola, koji je korišćen kao rastvarač, na promenu ekspresije analiziranih gena kao i na aktivnost katalaza, identično je postavljeni kontrolni eksperiment sa filter papirima natopljenim samo metanolom. Ovi uzorci korišćeni

su za normalizaciju ekspresije gena odnosno aktivnosti enzima za svaku pojedinačnu tačku i na taj način što im je dodeljivana vrednost 1. Za svaki tretman i za svaku vremensku tačku sakupljeno je i zamrzavano po 5 biljaka gajenih u jednom staklenom sudu, a koje su predstavljale jedan uzorak. Ceo eksperiment je urađen u dva nezavisna biološka ponavljanja.

### **3.7.2. Analiza ekspresije gena koji učestvuju u odbrambenom odgovoru krompira**

Nivo ekspresije odabranih gena praćen je metodom kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja (qPCR; eng. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), nakon što su prethodno svi iRNK (informacioni RNK) molekuli prevedeni u reakciji reverzne transkripcije (RT) u cDNK (komplementarne DNK) molekule. Praćenjem amplifikacije željenih sekvenci, korišćenjem gen specifičnih prajmera, u realnom vremenu utvrđen je indukcije ekspresije analiziranih gena nakon delovanja etarskog ulja.

#### **3.7.2.1. Izolacija ukupnih RNK**

Za izolaciju ukupnih RNK korišćeno je oko 150mg nadzemnih delova krompira koji je prethodno bio izložen delovanju etarskog ulja tokom različitih vremenskih perioda. Materijal je mehanički usitnjen u sterilnim avanima uz pomoć tečnog azota. Izolacija je vršena pomoću kita RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemačka) po protokolu proizvođača, koji je uključivao i tretman DNazom (RNase-Free DNase; Qiagen).

Izolacija je započeta liziranjem usitnjenog materijala u sterilnoj tubici pomoću 450  $\mu$ L RLT pufera, u koji je prethodno dodat  $\beta$ -merkaptetoetanol u odnosu 1:100 (v:v). Da bi se biljni sadržaj što bolje razgradio sadržaj tubice je inkubiran u vodenom kupatilu na temperaturi od 56°C, 3 minuta. Uzorak je zatim prebačen u QIAshredder spin kolone i centrifugiran 3 minna 14000 $\times$ g. Supernatant je prebačen u novu ependorf tubicu, a zatim je dodato 250  $\mu$ L apsolutnog etanola radi precipitacije RNK. Ova smeša je potom prebačena u RNase spin kolonu smeštenu u nove ependorf tubice od 2 mL. Centrifugiranjem u trajanju od 15 s na 10000  $\times$  g obezbeđeno je razdvajanje i vezivanje RNK za membranu kolone, kao i

uklanjanje većeg dela DNK koji se odbacuje zajedno sa supernatantom. RNase spin kolona je premeštena u novu ependorf tubicu i membrana je isprana RW1 puferom centrifugiranjem na  $10000 \times g$  u trajanju od 15 s. Nakon ovog koraka uključen je i dodatni tretman DNazom, koja se nanosi direktno na membranu RNeasy spin kolone. Nakon 15 minuta inkubacije sa DNazom nastavljeno je ispiranje RPE puferom. RNase spin kolone sa RNK molekulima precipitiranim na membranama prebačene su u kolekcione tubice i izvršeno je spiranje i rastvaranje RNK u  $60 \mu\text{L}$  RNase-free vode.

Koncentracija ukupnih izolovanih RNK određena je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 260 nm i izračunata prema formuli:

$$c(\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times 40 \times 100$$

gde je

$A_{260}$  – apsorbanca RNK na 260 nm

$40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  – koncentracija jednolančane RNK pri  $A_{260} = 1$

100 – faktor razblaženja

Integritet izolovanih RNK je procenjen elektroforetskim razdvajanjem  $1 \mu\text{g}$  izolovanih RNK na 1,2% TBE (45 mM Tris-borat i 1 mM EDTA) agaroznom gelu, prema standardnoj proceduri (Sambrook i sar. 1989). Nakon razdvajanja u kadici za horizontalnu elektroforezu BlueMarine 100 (Serva electrophoresis GmbH, Velika Britanija) u TBE puferu sa dodatkom  $0,5 \mu\text{g/mL}$  etidijum-bromida (Valeant Pharmaceuticals, Montreal, Kanada) vizuelizacija RNK traka je izvršena posmatranjem pod UV svetlom na transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Explorer, Exton, PA).

Nakon odredjivanja koncentracije i provere kvaliteta RNK izolati su čuvani na  $-80^\circ\text{C}$  do trenutka daljeg korišćenja.

### 3.7.2.2. Reverzna transkripcija RNK molekula (RT)

Za prevođenje iRNK molekula u cDNK korišćen je GeneAmp<sup>®</sup> Gold RNA PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). U svaku reakciju unošeno je 200 ng ukupnih izolovanih RNK. Za svaku reakciju koja se odvijala u zapremini od 20  $\mu$ L dodavano je 4  $\mu$ L 5 $\times$ RT pufera, 2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2  $\mu$ L dNTP miksa (finalna koncentracija svakog 1 mM), 2  $\mu$ L DTT (finalna koncentracija 10 mM), 0,5  $\mu$ L oligo-dT prajmera koncentracije 1,25 mM, 0,5  $\mu$ L rekombinantnog inhibitora RNaza (20 U/ $\mu$ L), 0,3  $\mu$ L MultiScribe<sup>®</sup> transcriptaze (finalna koncentracija 0,75 U/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L ukupnih RNK koncentracije 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ L i 6,7  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Reakcija reverzne transkripcije se odvijala u dva koraka na 25°C tokom 10 min i zatim na 42°C, 12 min u aparatu Mastercycler<sup>®</sup> Nexus Gradient (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

### 3.7.2.3. Kvantitativna PCR reakcija (qPCR)

Za određivanje nivoa ekspresije ispitivanih gena korišćena je qPCR metoda. Sastav reakcione smeše koncipiran je po uputstvu proizvođača korišćenog kita - Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo Scientific) a korišćeni su prajmeri specifični za analizirane gene (Tabela 5). Maxima SYBR Green/ROX Master Mix sadržifluorescentnu boju SYBR Green I koja omogućuje detekciju i analizu DNK molekula u vremenu. ROX boja je pasivna referentna fluorescentna boja kojom se normalizuju varijacije između reakcija i eventualne greške pri pipetiranju jer se ne vezuje za DNK i ima konstantnu fluorescenciju tokom reakcije.

Reakciona smeša finalne zapremine 25  $\mu$ L sadržala je 12,5  $\mu$ L SYBR Master Mixa, po 1,5  $\mu$ L F i R prajmera (Tabela 5), 1  $\mu$ L cDNK (za *PoAc58* i *StPIN1*) ili 2,5  $\mu$ L cDNK (za ostale ispitivane gene) i 7  $\mu$ L H<sub>2</sub>O.

Pored cDNK ispitivanih uzoraka dobijene nakon RT reakcije, na svaku pločicu postavljana je i negativna kontrola (NTC; eng. *Non Template Control*), koja je umesto cDNK sadržala

2,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Sve reakcije su rađene u tri tehnička ponavljanja u mašini ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

**Tabela 5.** Sekvence prajmera korišćenih za PCR i qPCR amplifikaciju.

<i>Gen</i>	<i>Prajmer</i>	<i>5'-3'sekvenca</i>	<i>Referenca</i>
<b><i>PoAc58</i></b>	F	TGTTGGACTCTGGTGATGGTG	Raspor et al. (2012)
	R	AGTAACCACGCTCAGTGAGGA	
<b><i>PALI</i></b>	F	TTGCACAAGTTGCATCCATT	Derksen et al. (2013)
	R	AAGAGCACCACCATTTTTGG	
<b><i>PR-2</i></b>	F	ATTTGGTGCCACACAAGACA	Derksen et al. (2013)
	R	TTGGGGAAAACAATCCAAAA	
<b><i>PR-5</i></b>	F	AGCGTTTTTCAGCCAAAGTGT	Derksen et al. (2013)
	R	ATTGTCCCTTCACGGTATGG	
<b><i>Pin2</i></b>	F	CATCTTCTGGATTGCCCA	Kawazu et al. (2012)
	R	ACACACAACCTTGATGCCAC	

Sve reakcije su započinjale početnom denaturacijom cDNK na 95°C (5 min) a zatim je sledilo 40 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije na 95°C tokom 30 s, vezivanja prajmera na 60 °C tokom 1 min i ekstenzije na 72°C tokom 1 min. Po završetku 40. ciklusa sledila je finalna ekstenzija na 72°C tokom 10 min i analiza krive topljenja. Analiza krive topljenja je poslužila za analizu specifičnosti amplifikacije odgovarajućih gena kod ispitivanih uzoraka.

Kako bi se odredila efikasnost qPCR reakcije, za svaki par korišćenih prajmera napravljene su standardne krive pomoću serije razblaženja nekog od uzoraka.



### 3.7.3. Detekcija isparljivih organskih jedinjenja uređajem PTR-MS

Detekcija isparljivih organskih jedinjenja (VOC) prisutnih u atmosferi staklenih posuda u kojima je gajen krompir vršena je uređajem *Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry (PTR-MS)* (*Ionicon, Analytik, Innsbruck, Austria*). Metoda iskorišćena u ovom uređaju zasnovana je na reakciji hemijske jonizacije u kojoj dolazi do transfera protona sa primarnih jona  $\text{H}_3\text{O}^+$  na molekule VOC. Detekcioni sistem uređaja čini kvadrupol, koji vrši kvantifikaciju protonizovanih molekula organskih jedinjenja  $[\text{M}+1]^+$  čiji je afinitet prema protonu veći od afiniteta prema protonu molekula vode. Najveća prednost ove metode u odnosu na komplementarne je mogućnost merenja koncentracija u realnom vremenu bez prethodne pripreme uzorka, dok su ostale karakteristike samog uređaja velika osetljivost (preko 2500 cps ppb<sup>-1</sup>) i nizak prag detekcije (od nekoliko ppq do nekoliko desetina ppt). Kao nedostatak ove metode najčešće se navodi nemogućnost razdvajanja izobarnih jedinjenja, što je tokom primene metode u ovom eksperimentu prevaziđeno identifikacijom grupe jedinjenja za koje je od ranije poznato da se detektuju na određenoj masi (pri čemu svaka grupa predstavlja skup isparljivih hemijskih jedinjenja sa približno istom masom).

U pilot eksperimentu realizovanom u Laboratoriji za fiziku životne sredine u Institutu za fiziku u Beogradu, vršeno je merenja koncentracija VOC koji se detektuju na protonizovanim masama  $m/z$  (135,00'; 153,00'; 155,00' i 195,00') tokom tokom 72 sata. Korišćen je MID mod uređaja, pri čemu je vreme trajanja ciklusa bilo oko 10 s. Snimanje je rađeno u protočnom režimu, pri čemu je na početku eksperimenta na jedan od dva otvora na poklopcu teglice prvo "ukopčan" *inlet* uređaja, a odmah nakon toga na drugi otvor je prikačeno crevo sa protokom nultog gasa (sintetički vazduh VOC-free; protok vazduha 50 *sccm*). Ostali parametri uređaja tokom snimanja bili su: pritisak 2,19 *mbar* u reakcionoj komori i  $3,5 \times 10^{-5}$  *mbar* u detekcionoj komori, temperature inleta i drift bile su 60°C, dok je odbroj  $\text{H}_3\text{O}^+$  jona bio  $3,37 \times 10^6$  *cps*.

### 3.7.4. Analiza aktivnosti katalaza kod krompira tokom izlaganja etarskom ulju

Uporedo sa analizom ekspresije gena koji učestvuju u odbrambenom odgovoru, kod krompira gajenog *in vitro* praćena je i aktivnost enzima antioksidativne zaštite, katalaza, da bi se utvrdio nivo stresa koji je indukovao u biljkama krompira nakon izlaganja etarskom ulju.

#### 3.7.4.1. Izolacija proteina

Ukupni solubilni proteini su izolovani iz biljaka gajenih u uslovima opisanim u odeljku 3.7.1. i koje su nakon prikupljanja trenutno zamrznute u tečnom azotu i čuvane na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Smrzuto biljno tkivo je mehanički usitnjeno u tečnom azotu do finog praha a zatim je dodao hladni ekstrakcioni pufer u odnosu 2:1 (v/w). Ekstrakcioni pufer je sadržao 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM etilendiamintetrasirćetnu kiselinu (EDTA) (pH 8), 1 mM ditiotritol (DTT), 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), 10% (v/v) glicerol i 5% (w/v) polivinilpirolidon (PVP). Uzorci su nakon ekstrakcije centrifugirani na  $12000 \times g$ , tokom 10 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant je prebaćen u nove tubice a zatim ponovo centrifugiran pod istim uslovima. Dobijeni ekstrakt je podeljen u alikvote i korišćen za dalje analize.

Koncentracija ukupnih proteina je određena spektrofotometrijski pomoću BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*) proteinskog standarda, na talasnoj dužini od 595 nm (Bradford, 1976).

#### 3.7.4.2. Denaturišuća elektroforeza (SDS-PAGE) i imunodetekcija proteina

Izolovani proteini su pomešani sa puferom za uzorke (eng. *Sample Buffer*, SB; Laemmli, 1970) u odnosu 1:1 (v/v), koji je sadržao 62 mM Tris-HCl (pH 6,8); 2,5% (w/v) boje bromfenol-plavo (BPB); 2% (w/v) Na-dodecil-sulfata (SDS); 10% (v/v) glicerola i 0,5% (v/v)  $\beta$ -merkaptoetanol. Nakon dodavanja SB uzorci su inkubirani tokom 5 min na  $95^{\circ}\text{C}$ , a zatim kratko ohlađeni na  $+4^{\circ}\text{C}$  i centrifugirani 3 min na  $12000 \times g$ .

Denaturišući SDS-PAGE elektroforezom (eng. *SDS-polyacrilamide gel electrophoresis*) izvršeno je razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu koji se sastojao od 7% gela za razdvajanje (eng. *separating gel*) i 4% gela za koncentrovanje (eng. *stacking gel*). Na gelove su nanošene jednake zapremine uzoraka sa po 10g ukupnih proteina. Proteini su razdvajani na 120V tokom 2 sata u puferu za transfer (TB; eng. *Transfer Buffer*,) u aparaturi za vertikalnu elektroforezu Blue Vertical 102 (Serva Electrophoresis, GmbH, Nemačka). TB pufer je sadržao 25 mM Tris, 192 mM glicin i 0,1% SDS (w/v). Za određivanje molekulske mase proteina korišćen je obojeni proteinski marker opsega 10-260 kDa (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, 10-260 kDa, Fermentas). Nakon elektroforeze jedan gel je korišćen za bojenje ukupnih proteina, a drugi za detekciju specifičnih proteina imuno blot metodom.

Za bojenje ukupnih proteina gel je inkubiran u rastvoru boje tokom 45 minuta. Ovaj rastvor je sadržao 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue boje, 50% (v/v) metanola i 10% (v/v) glacijalne sirćetne kiseline. Nakon toga gel se obezbojava u PDS rastvoru (eng. *Protein Destaining Solution*). PDS rastvor je sadržao 15% (v/v) metanola i 7% (v/v) glacijalne sirćetne kiseline.

Za detekciju specifičnih proteina imuno blot (eng. *Immunoblotting*) metodom izvršen je elektrotransfer proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF (eng. *polyvinylidene difluoride*) membranu (Bio-Rad, SAD). Elektrotransfer je izvršen na 120V tokom 60min u TB puferu koji je sadržao 25 mM Tris-HCl i 192 mM glicin. Po završetku elektrotansfera, membrana je blokirana u 10% rastvoru nemasnog mleka (eng. *Non fat dry milk*; NFDm; Nestle, SAD) i T-PBS pufera (PBS pufer + 0.05% Tween-20). PBS pufer (eng. *Phosphate - Buffered Saline*) je sadržao 80 g/L NaCl; 2 g/L KCl; 26,8 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O i 2,4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Membrana je inkubirana preko noći u 10% rastvoru nemasnog mleka u T-PBS puferu, na +4°C.

Sledećeg dana membrane su ispirane u T-PBS (2 x 1 min) a zatim inkubirane u rastvorima primarnih antitela, uz blago mešanje, tokom 2 sata na sobnoj temperaturi.

Za imunodetekciju CAT korišćena su poliklonalna antitela dobijena imunizacijom miša (*Anti-Rabbit Catalase*, kat. br. ab1877; Abcam, SAD) rastvorena u T-PBS puferu koji je sadržao 5% NFDM, u odnosu 1:1000 (v:v).

Sve membrane korišćene za imunodetekciju specifičnih proteina su nakon inkubacije u rastvorima primarnih antitela ispirane  $2 \times 1$  min i  $3 \times 10$  min u T-PBS puferu. Membrane su zatim inkubirane u rastvoru sekundarnih antitela tokom 2 sata, na sobnoj temperaturi.

U radu su korišćena komercijalna sekundarna antitela, koja su konjugovana sa peroksidazom iz rena (Goat Anti-Rabbit IgG-HRP, kat. br. A0545; Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) rastvorena u T-PBS puferu koji sadrži 5% NFDM, u odnosu 1:20000 (v:v).

Nakon inkubacije u rastvoru sekundarnih antitela sve membrane za imunodetekciju su ispirane u T-PBS puferu,  $2 \times 1$  min a zatim  $3 \times 10$  min. Po završetku ispiranja u puferu membrane su inkubirane 5 min u ECL (eng. *Enhanced Chemiluminescence*) detekcionom reagensu koji je sadržao 0,2 mM *p*-kumarnu kiselinu, 1,25 mM 3-amino ftalidrazid (luminol) i 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 100 mM Tris-HCl puferu (pH 8,5).

#### **3.7.4.3. Nativna elektroforeza (Native PAGE)**

Nativnom elektroforezom izvršeno je razdvajanje enzimskih izoformi na diskontinuiranim poliakrilamidnim gelovima koji se sastojali od 10% gela za razdvajanje i 4% gela za koncentrovanje. Razdvajanje proteina je vršeno korišćenjem Mini-Protean Tetra Cell sistema (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) tokom 150 min na +4°C pri voltaži od 120 V, u Tris-glicin TB pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM glicin) (Laemmli, 1970). Na gelove su nanošene jednake zapremine uzoraka sa po 10 µg ukupnih proteina. Nakon razdvajanja izoformi na gelovima, pomoću specifičnog bojenja detektovana je aktivnost CAT.

Aktivnost CAT detektovana je metodom koju su opisali Woodbury i sar. (1971). Gelovi su inkubirani 10 min u 0,01% (v/v) rastvoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zatim su kratko isprani destilovanom vodom i inkubirani su još 10 min u rastvoru za bojenje koji je sadržao 0,123 mM gvožđe(III)-hlorid (FeCl<sub>3</sub>) i 0,061 mM kalijum-heksacijanoferrat(III) [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>]. Novonastalo jedinjenje KFe<sup>III</sup>(Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>) boji gel plavo-zeleno a na mestima na gelu gde je

prisutna CAT dolazi do degradacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> što uzrokuje pojavljivanje bezbojnih traka. Reakcija se zaustavlja ispiranjem gela destilovanom vodom u trenutku kada se trake najbolje uočavaju.

#### 3.7.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti CAT

Za određivanje aktivnosti CAT korišćena je metoda koju je opisao Aebi (1984). Spektrofotometrijski (Agilent 8453) je praćena kinetikapotrošnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u reakcionoj smeši na 240 nm. Reakciona smeša (1 mL) se sastojala od 50 mM Na-K-fosfatnog pufera i 10 µL proteinskog izolata. Reakcija počinje dodavanjem 0,07% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aktivnost CAT je izračunava prema jednačini:

$$A_{CAT} = \frac{(\Delta A - \Delta A_0) \times V_K \times 1000}{0.0436 \times V_U}$$

$\Delta A$  – promena apsorbance u minuti [1/(min x cm)]

$\Delta A_0$  – promena apsorbance blank rastvora u minuti [1/(min x cm)]

$V_K$  – zapremina reakcione smeše (mL)

$V_U$  – zapremina uzorka (mL)

0,0436 – milimolarni ekstikcioni koeficijent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 240 nm [1/mMx cm)].

Specifična CAT aktivnost se izražava u jedinicama (U) koje predstavljaju brojmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji se razgradi u min (µmol/min).

Specifična aktivnost CAT je izražena kao broj jedinica enzimske aktivnosti (U) po mg solubilnih proteina. Rezultati su za svaku pojedinačnu vremensku tačku predstavljeni relativno u odnosu na aktivnosti dobijene u kontrolnim uzorcima tretiranim čistim metanolom kojima je dodeljena vrednost 1. Prikazane vrednosti su izražene kao srednja vrednost dva biološka ponavljanja za svaki uzorak.

### 3.8. Statistička analiza podataka

Za analizu podataka u svim eksperimentima određene su srednje vrednosti i standardne greške ( $\pm$ SE) a vrednosti su poređene jednofaktorsko analizom varijanse (ANOVA). Kod vrednosti izraženih u procentima pri jednofaktorskoj analizi varijanse izvršena je arkus-sinus transformacija vrednosti. Nakon jednofaktorske analize varijanse, za specifična poređenja između eksperimentalnih grupa primenjeni su *post hoc* LSD ili Dankanov test na nivou značajnosti 0,05. Pirsonovi koeficijenti korelacije (R) (eng. *Pearson's correlation coefficients*) su izračunati između ukupnog sadržajafenolnih komponenti sa jedne i rezultata antioksidativnih testova sa druge strane. Statistička obrada podataka izvršena je uz pomoć softverskog paketa Statistica 7.0. (StatSoft, Inc).

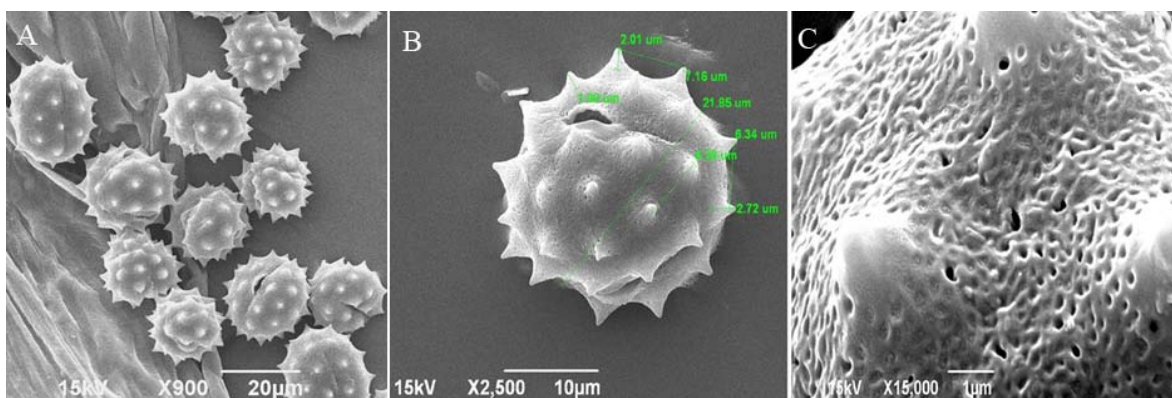
U biotesu sa larvama gubara za procenu značajnosti razlika indeksa rasta i ishrane kod gusenica gajenih na veštačkoj hrani sa dodacima rastvora etarskog ulja korišćena je jednofaktorska analiza kovarijanse (ANCOVA). Kao zavisno promenljive u jednofaktorskoj analizi kovarijanse korišćeni su brojioci iz formula Waldbauer-a (1968) za izračunavanje indeksa rasta i ishrane prema formulama. Kao zavisno promenljiva za relativnu brzinu rasta (RGR) je korišćena prosečna promena mase po danu, za relativnu brzinu konzumacije hrane (RCR) korišćena je masa konzumirane hrane po danu, za efikasnost asimilacije (AD) korišćena je razlika u masi konzumirane hrane i ekskrementa, odnosno masa asimilovane hrane, dok je za efikasnost konverzije unete hrane (ECI) i efikasnosti konverzije svaene hrane (ECD) kao zavisno promenljiva korišćena razlika u masi gusenica na kraju ogleđa i početne mase gusenica. Imenioci iz formula Waldbauer-a su u jednofaktorskoj analizi kovarijanse korišćeni kao kovarijati. Za relativnu brzinu rasta (RGR) i relativnu brzinu konzumacije hrane (RCR) kao kovarijat je korišćena početna masa gusenica. Za efikasnost asimilacije (AD) i efikasnosti konverzije unete hrane (ECI) kao kovarijat je korišćena masa konzumirane hrane a za efikasnost konverzije svaene hrane (ECD) kao kovarijat je korišćena masa asimilovane hrane (Raubenheimer and Simpson, 1992). Jednofaktorska analiza kovarijanse i poređenje srednjih vrednosti između eksperimentalnih grupa Dankanovim *post hoc* testom na nivou značajnosti 0,05 računati su na transformisanim vrednostima, za parametre RGR i RCR po formuli ( $\sqrt{x} + 0.5$ ) a za parametre AD, ECI i ECD po formuli ( $\text{asin}(\sqrt{x})$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Ispitivanje mikromorfologije polena

Polenova zrna *T. vulgare* ispitivana pomoću SEM mogu se opisati kao sferoidna, radijalno simetrična, izopolarna sa tri klicine brazde ili kolpe. U polarnom prikazu oblik polena je sferoidan, dok je u ekvatorijalnom prikazu sferoidan do blago eliptičan (Slika 4.1.). Prosečna dužina polenovog zrna (polarni prikaz) iznosila je  $24,32 \pm 1,12 \mu\text{m}$  dok je prosečna širina (ekvatorijalni prikaz) bila  $20,04 \pm 0,98 \mu\text{m}$ . Odnos širine i dužine iznosio je 0,94. Kolpe su postavljene meridijalno duž polenovog zrna i u njihovom centru se nalazi po jedna pora (apertura) koja nije uvek jasno vidljiva (Slika 4.1. A i B).

Ispitivanje ornamentacije egzine pokazalo je da se polenova zrna *T. vulgare* karakterišu mikroretikularno-perforiranom egzinom sa karakterističnim bodljama, sa 1-3 perforacijena  $1 \mu\text{m}^2$  egzine (Slika 4.1. C). Bodlje su konkavne sa proširenom osnovom a prosečna visina bodlji iznosila je  $2,72 \pm 0,29 \mu\text{m}$ .

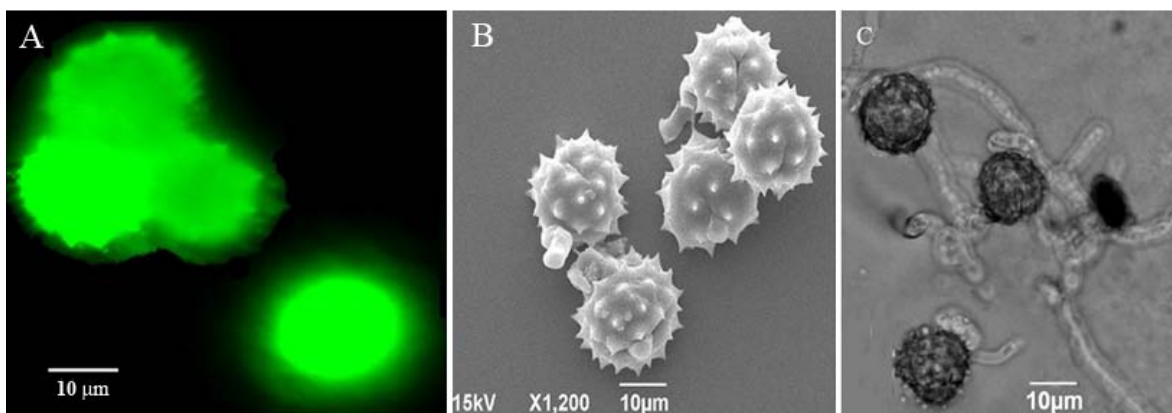


**Slika 4.1.** SEM mikrografije polenovih zrna *T. vulgare* (A i B) sa detaljima ornamentacije egzine (C).

### 4.2. Ispitivanje vijabilnosti i klijavosti polena *in vitro*

Vijabilnost polena *T. vulgare* je utvrđena metodom histološkog bojenja fluorescein-diacetatom (FDA). Analizirano je 600 polenovih zrna koja su pokazala visok stepen vijabilnosti nakon bojenja. Procenat vijabilnih polenovih zrna iznosio je 87%. Vijabilna

polenova zrna su na fluorescentnom mikroskopu intezivno fluorescirala zelenom bojom (Slika 4.2. A).

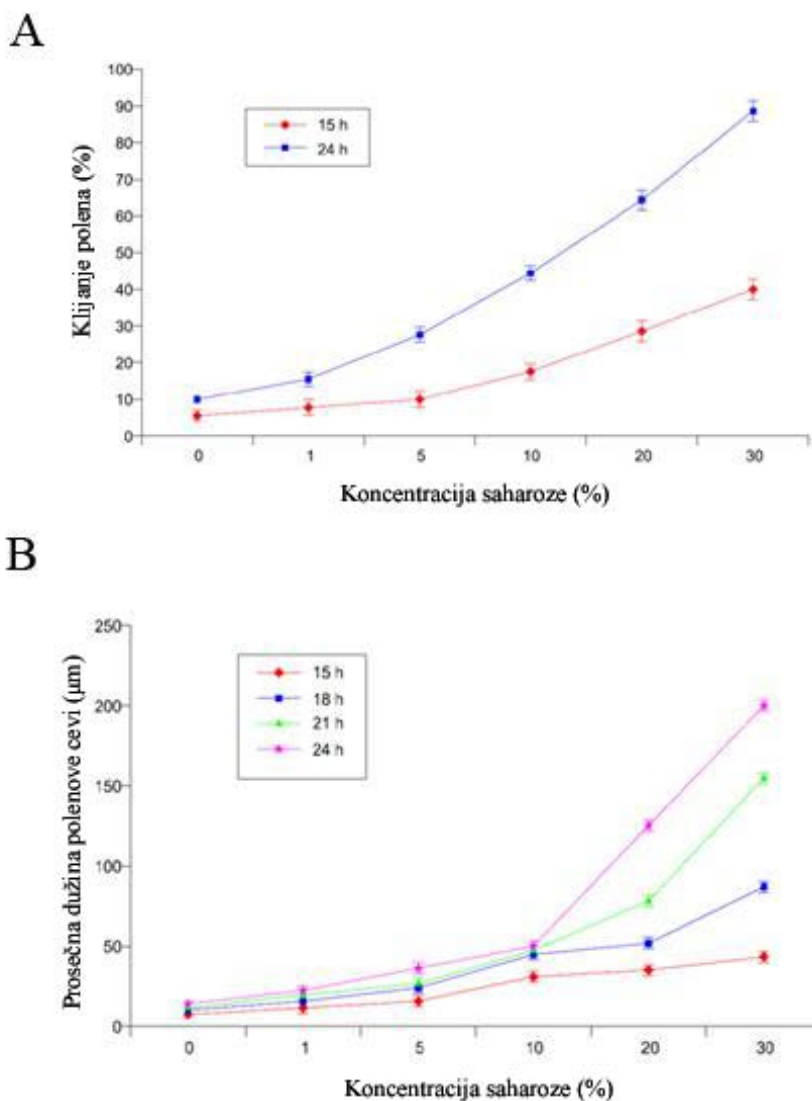


**Slika 4.2.** Vijabilna polenova zrna posmatrana na fluorescentnom mikroskopu (A), klijala polenova zrna posmatrana na SEM (B) i svetlosnom mikroskopu (C).

Klijavost polena *in vitro* na agaro-saharoznoj podlozi je pouzdana metoda za određivanje vitalnosti polena. Procenat iskljalih polenovih zrna određivan je posle 15 i 24 h od postavljanja na podlogu sa različitim procentom saharoze (0; 1; 5; 10; 20 i 30%).

Efekat saharoze u podlozi na klijanje polena je varirao je u zavisnosti od koncentracije i proteklog vremena inkubacije (Slika 4.3.A). Rezultati su pokazali da procenat iskljalih polenovih zrna raste sa porastom koncentracije saharoze u podlozi, te je broj iskljalih polenovih zrna na podlozi sa 30% saharoze bio oko 8 puta veći nego na kontrolnoj podlozi koja nije sadržala saharozu. Takođe, pokazano je i da se procenat klijavosti povećava ukoliko je inkubacija produžena. Tako je najveći procenat iskljalih polenovih zrna od 87% zabeležen posle 24 h na podlozi sa 30% saharoze.





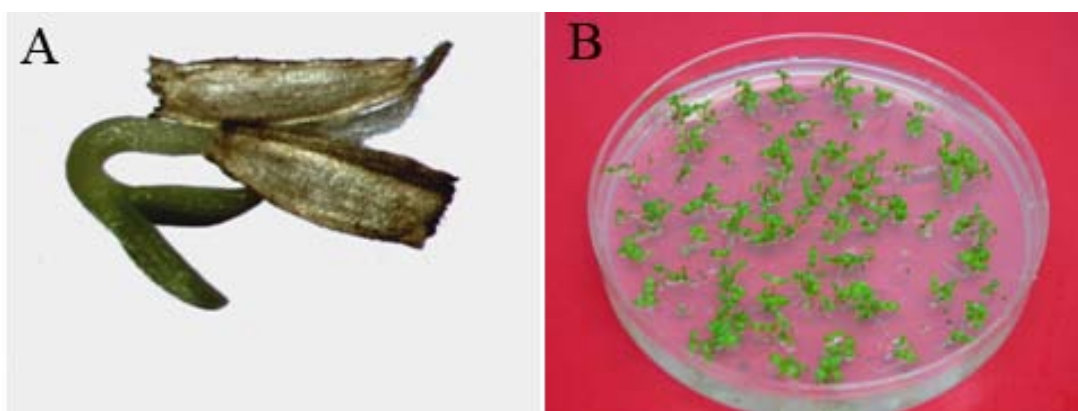
**Slika 4.3.** Klijavost polena *in vitro*. (A) Zavisnost klijanja polena od koncentracije saharoze u hranljivoj podlozi, (B) rast polenove cevi na hranljivim podlogama sa različitim koncentracijom saharoze.

Nakon isključavanja tokom 24 h praćen je i rast polenove cevi i to nakon 15, 18, 21 i 24 h od postavljanja na podlogu sa različitim sadržajem saharoze (Slika 4.3.B). Povećanje koncentracije saharozeu podlozi, kao i vreme inkubacije pozitivnosu uticali i na rast

polenove cevi. Najduže polenove cevi izmerene su nakon 24 h na podlozi sa 30% saharoze (oko 200  $\mu\text{m}$ ).

### 4.3. Gajenje biljaka *in vitro*

Semena *T.vulgare* dobijena sa biljaka prikupljenih iz prirode klijala su u velikom procentu (Slika 4.4.). Nakon 15 dana na BM bez BRR iskljalo je čak je 97,8% semena postavljenih na hranljivu podlogu.

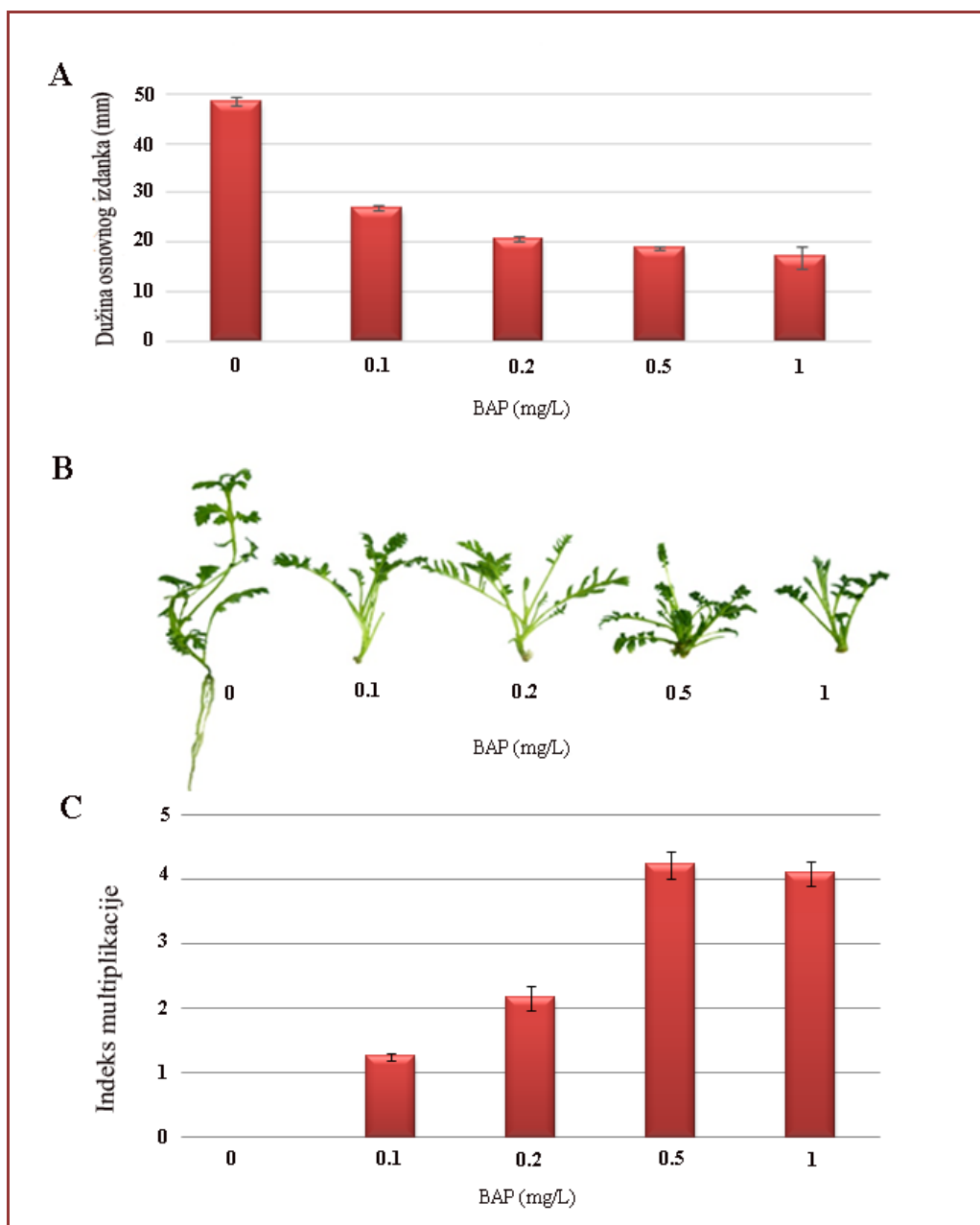


**Slika 4.4.** Iskljano seme *T. vulgare* posmatrano pod binokulranom lupom (A), klijanci (B).

Radi multiplikacije izdanaka, apikalni odsecci biljaka koje su se razvile iz klijanaca gajeni su tokom 4 nedelje na medijumu za umnožavanje koji je sadržavao BAP u koncentracijama 0; 0,1; 0,2; 0,5 i 1 mg/L. Različite koncentracije BAP su značajno uticale na izduživanje osnovnog izdanka, ali i na indeks multiplikacije, odnosno prosečan broj novih izdanaka (Slika 4.5.).

Različite koncentracije BAP u hranljivoj podlozi značajno su uticale na izduživanje osnovnog izdanka i to tako što je povećanje koncentracije BAP u hranljivoj podlozi dovelo do redukcije rasteanja izdanka (Slika 4.5.A i B). Prosečna dužina osnovnog izdanaka je bila najveća kod biljaka koje su gajene na kontrolnoj hranljivoj podlozi bez BRR i iznosila je 48,54 mm. Već pri najnižoj primenjenoj koncentraciji od 0.1 mg/L BAP došlo je do

značajnog usporavanja rastenja i biljke su nakon 4 nedelje imale čak za više od 50% niže stablo u odnosu na biljke rasle na podlozi bez BAP (26,98 mm).

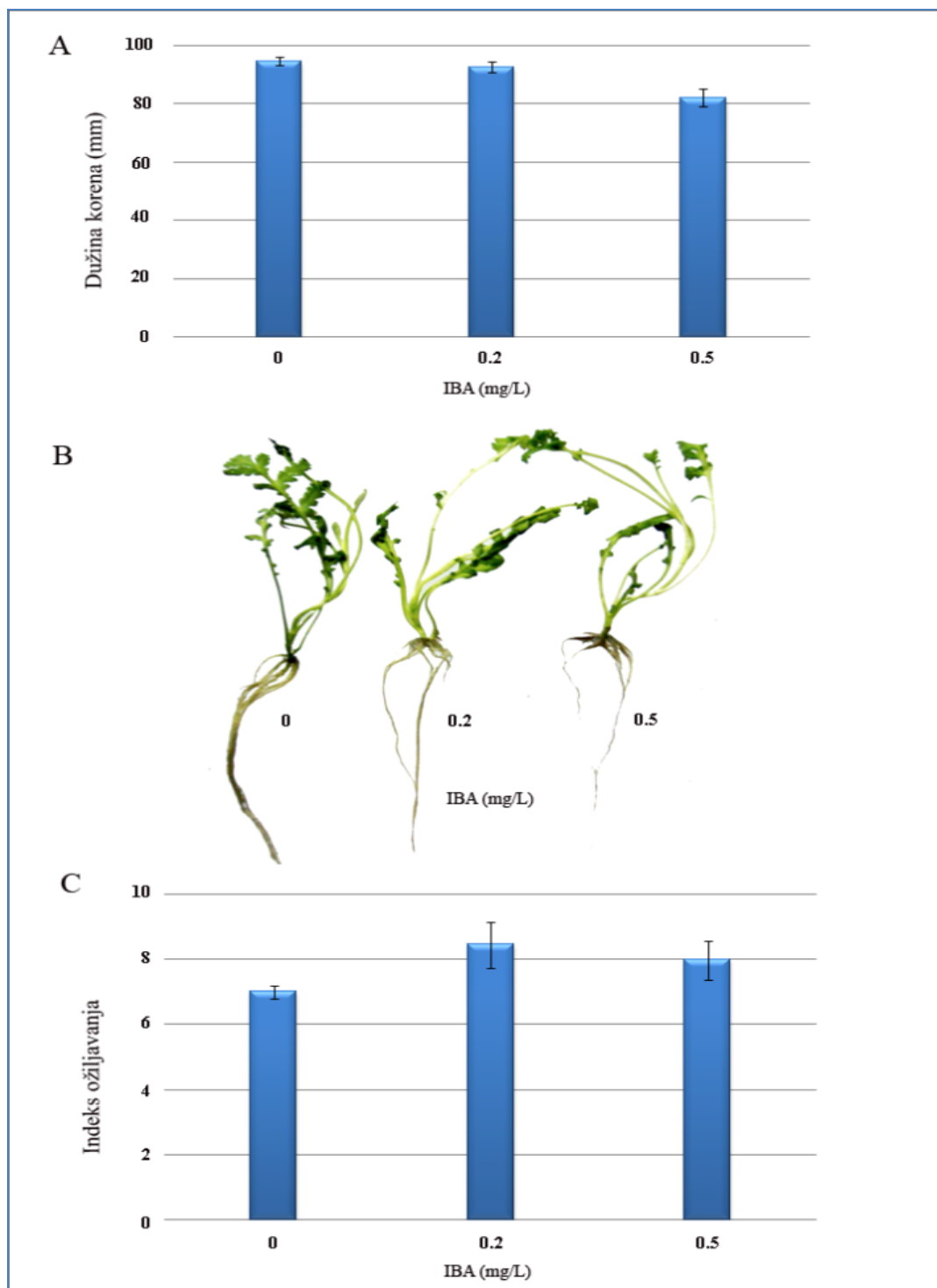


**Slika 4.5.** Izduživanje i multiplikacija izdanaka *T. vulgare*. (A) Dužina osnovnog izdanka, (B) izgled i (C) indeks multiplikacije izdanaka *T. vulgare* na podlogama sa različitom koncentracijom BAP.

Sa povećavanjem koncentracije BAP u podlozi od 0,2 do 1 mg/L dužina glavnog izdanka se nije značajno menjala te su glavni izdanci biljaka na podlozi sa 1mg/L BAP bili dugi u proseku 17 mm. Osim usporavanja izduživanja, BAP prisutan u podlozi je značajno uticao i na multiplikaciju izdanaka *T. vulgare* (Slika 4.5.A i C). Suprotno od izduživanja, BAP je pospešivao multiplikaciju te su se sa dodatkom ovog BRR pojavile i razvijale bočne grane kojih kod kontrolnih biljaka nije bilo (Slika 4.5.C). Biljke gajene na podlozi obogaćenoj sa 0,1 mg/L BAP imale su indeks multiplikacije od 1,25 dok je kod biljaka gajenih na podlozi sa 0,2 mg/L BAP indeks multiplikacije skoro dupliran i iznosio je 2,16. Najvećim indeksom multiplikacije odlikovale su se biljke gajene na hranljivoj podlozi sa 0,5 mg/L BAP (4,22).

Na umnoženim izdancima dalje je testirana sposobnost ožiljavanja (Slika 4.6.). Izdanci su postavljeni na hranljive podloge koje su sadržale IBA u koncentracijama 0; 0,2 i 0,5 mg/L. Pokazano je da je dodavanje IBA u hranljivu podlogu značajno uticalo na rast korena tek pri višim koncentracijama (Slika 4.6. A i B). Tako su biljke gajene na hranljivoj podlozi bez BRR imale najduži koren (94,7 mm), dok je prosečna dužina korena kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa 0,2 mg/L IBA bila slična i iznosila je 92,6 mm. Do statistički značajnog smanjenja prosečne dužine korena došlo je tek kod biljaka gajenih na podlozi sa 0,5 mg/L IBA (82,1 mm).

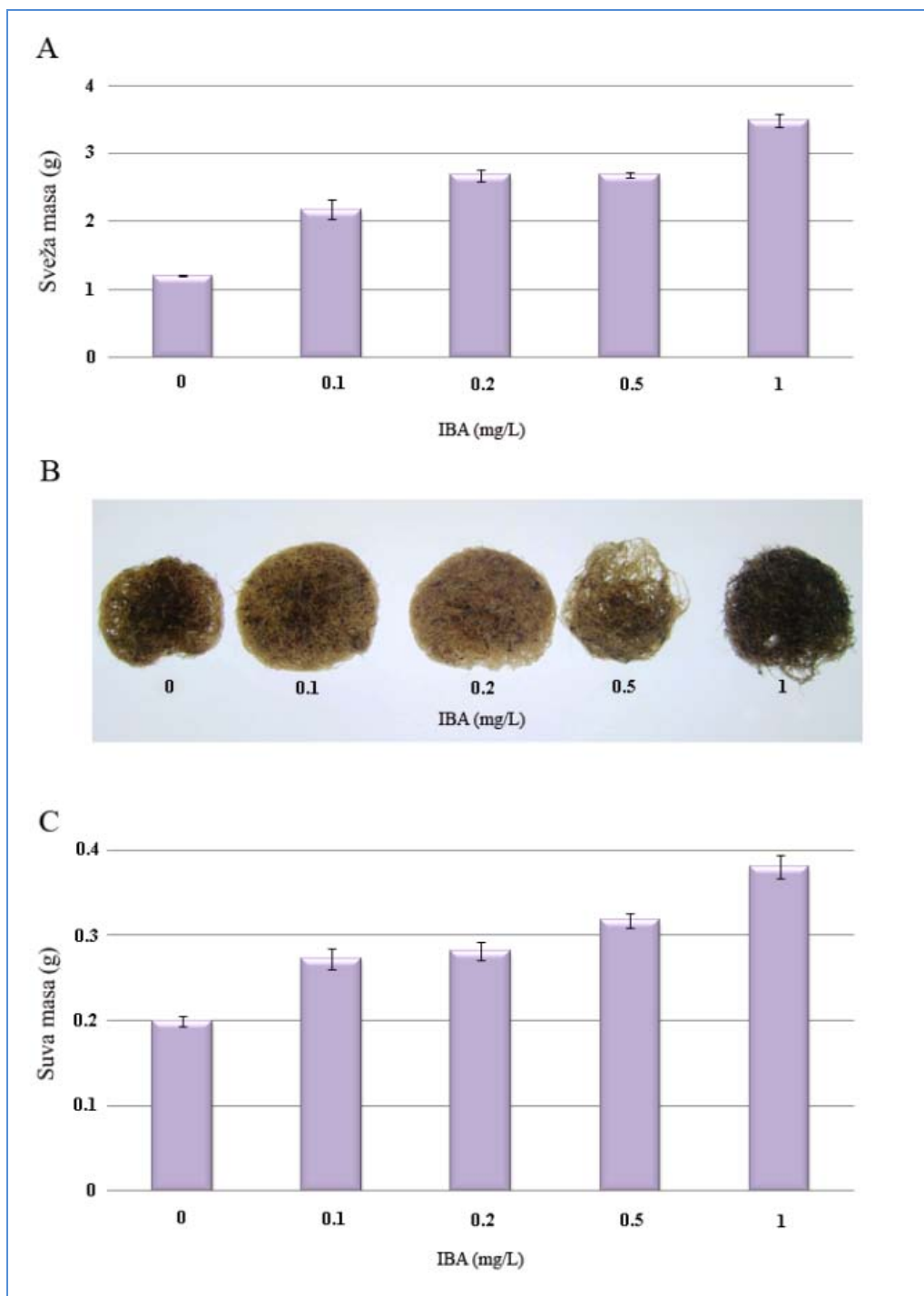
Nakon 4 nedelje gajenja, različite koncentracije IBA u podlozi su značajno uticale i na prosečan broj korenova po biljci (Slika 4.6. B i C). Ali dok je izlaganje IBA-i smanjivalo dužinu korena, prisustvo ovog BRR je pospešivalo formiranje korenova. Biljke gajene na hranljivoj podlozi bez BRR imale su najmanji prosečan broj sa oko 7 korenova po biljci. Dodavanjem IBA broj korenova po biljci se statistički značajno povećao, te je na hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 0,2 mg/L IBA iznosio 8,44 a na podlozi sa 0,5 mg/L IBA 7,97.



**Slika 4.6.** Izduživanje korena i ožiljavanje izdanaka *T. vulgare*. (A) Dužina osnovnog korena, (B) izgled i (C) indeks ožiljavanja izdanaka *T. vulgare* na podlogama sa različitom koncentracijom IBA.

Sa biljaka gajenih na hranljivoj podlozi bez BRR skidani su korenovi i postavljeni u tečnu MS<sup>1/2</sup> hranljivu podlogu obogaćenu sa 0; 0,1; 0,2; 0,5 i 1 mg/L IBA u cilju uspostavljanja kulture korenova. Nakon 4 nedelje gajenja merena je sveža masa korenova, a posle 7 dana i suva masa. Dok su korenovi gajeni na tečnoj hranljivoj podlozi bez BRR imali prosečnu masu od 1,2 g dodavanje IBA u tečnu hranljivu podlogu značajno je uticalo na prirast mase gajenih korenova (Slika 4.7.A i B). Već na 0,1 mg/L IBA prosečna masa korenova bila je skoro 2 puta veća i iznosila je 2,18 g. Sa daljim povećanjem koncentracije ovog BRR masa korenova se i dalje povećavala (2,69 g na 0,2 mg/L IBA i 0,5 mg/L IBA) Korenovi *T. vulgare* su najviše povećali svoju biomasu rastući u tečnom medijumu sa dodatkom 1 mg/L IBA i nakon 4 nedelje gajenja njihova masa je bila 3,49 g što je predstavljalo povećanje od skoro 3,5 puta u odnosu na masu korenova raslih bez dodatka IBA.

Nakon perioda sušenja na sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana korenovi su smanjili masu i to 6 puta na podlozi bez IBA a od 8 (0,1 mg/L IBA) do skoro 10 puta (na svim ostalim koncentracijama IBA) (Slika 4.7.B i C). Masa suvih korenova je bila najniža kod korenova gajenih na hranljivoj podlozi bez BRR (0,2 g), a najviša kod onih gajenih na 1 mg/L IBA (0,38 g).



**Slika 4.7.** Kultura korenova *T. vulgare*. (A) Sveža masa, (B) izgled i (C) suva masa korenova *T. vulgare* gajenih 4 nedelje na podlogama sa različitom koncentracijom IBA.

#### **4.4. Mikromorfološka i histološka analiza lista i karakterizacija sekundarnih metabolita biljaka gajenih *in vitro***

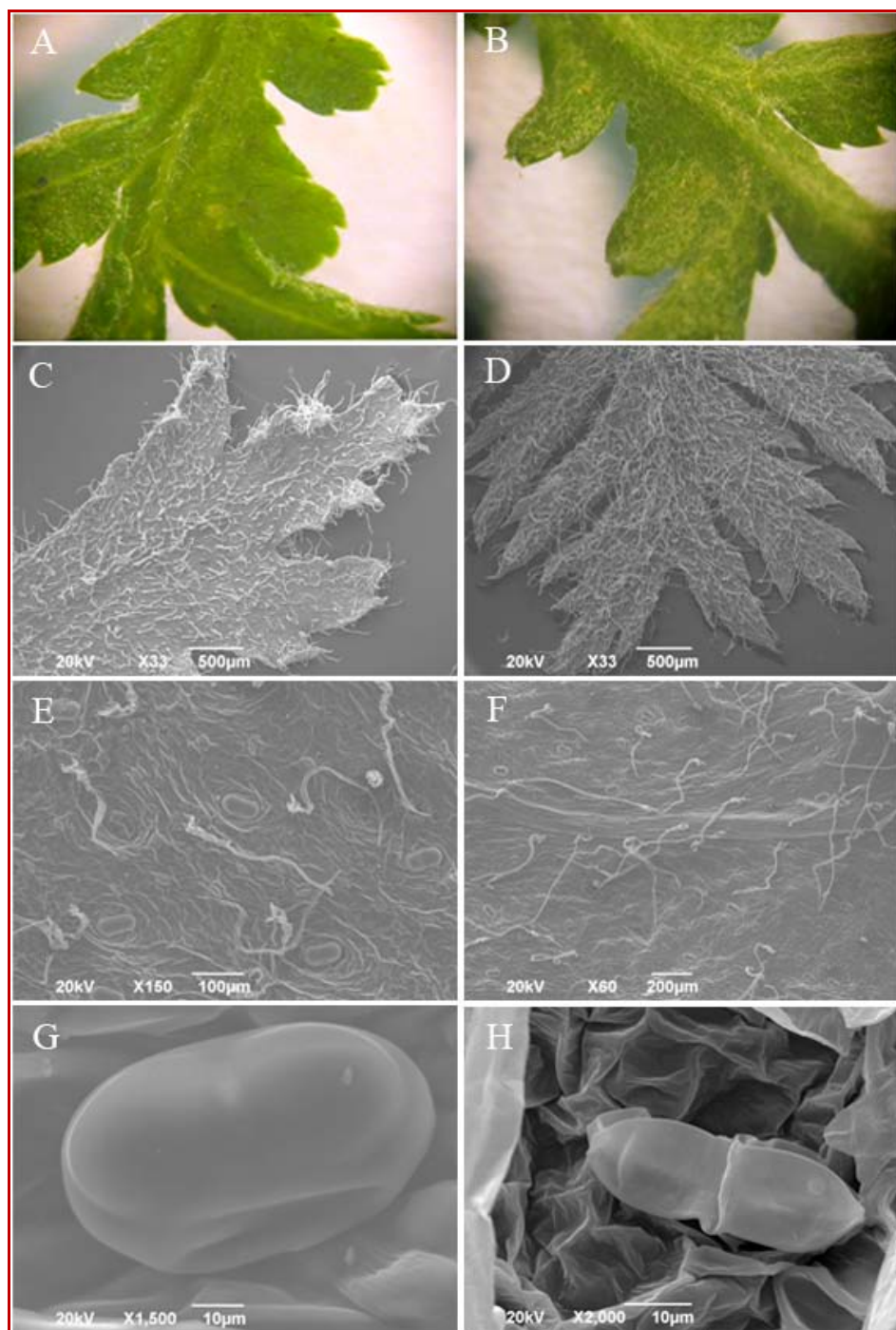
Radi morfološke i histološke karakterizacije lista *in vitro* gajenih biljaka *T. vulgare*, kao i karakterizacije sekretornih struktura i sekundarnih metabolita izvršene su analize uz pomoć skenirajućeg elektronskog mikroskopa, svetlosnog mikroskopa, binokularne lupe i odgovarajućih histochemijskih bojenja.

##### **4.4.1. Mikromorfološka analiza lista *T. vulgare* binokularnom lupom i skenirajućom elektronskom mikroskopijom**

Listovi *T. vulgare* su naizmenični, dvostruko perasto deljeni sa nazubljenim ivicama (Slika 4.8.). Abaksijalna i adaksijalna površina lista prekrivene su glandularnim (žlezdanim) i neglandularnim (mehaničkim) trihomama (Slika 4.8.).

Obe vrste trihoma su raspoređene i duž stabljike ali u ređoj distribuciji. Neglandularne trihome su dugačke, izuvijane i gušće raspoređene na abaksijalnoj površini lista. Ova površina lista poseduje epidermis sa naglašenijim karakterističnim naborima. Na mlađim listovima trihome su gusto raspoređene jedna do druge jer njihov broj ostaje stalan i kod lista u zreom stadijumu. Žlezdane trihome su biserijatnog tipa. Na obe površine pored žlezdanih i mehaničkih trihoma jasno su uočljive i stome (Slika 4.8., E i F).

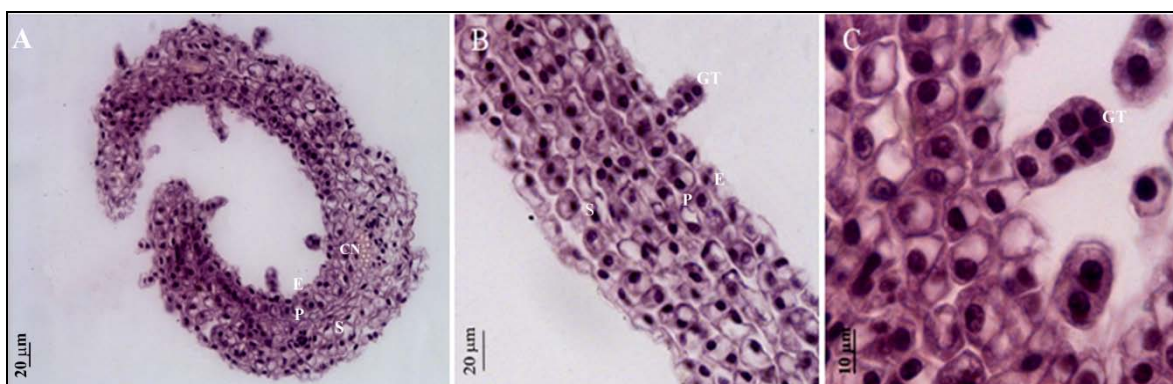




**Slika 4.8.** List *T. vulgare* posmatran binokularnom lupomi skenirajućim elektronskim mikroskopom. (A) lice i (B) naličje lista posmatrano binokularnom lupom; elektronske mikrografije (C) lica; (D) naličja lista; (E) indumentum lica sa vidljivim glandularnim i mehaničkim trihomama; (F) indumentum naličja sa vidljivim glandularnim i mehaničkim trihomama; (G) glandularna biserijatna trihoma sa sekrecionim sadržajem; (H) glandularna biserijatna trihoma bez sekrecionog sadržaja.

#### 4.4.2. Histološka analiza lista svetlosnom mikroskopijom

Na poprečnom preseku *in vitro* gajenog lista *T. vulgare* jasno se uočavaju ćelije gornjeg i donjeg epidermisa kao i palisadni i sunderasti mezofil (Slika 4.9). Ćelije epidermisa su pravougaonog oblika, gusto zbijene sa tankom kutikulom. U nivou gornjeg i donjeg epidermalnog sloja vidljive su i stomine ćelije. U centralnom nervu lista nalazi se kolateralni zatvoreni provodni snopić. Fotosintetičko tkivo je zastupljeno sa 1-2 sloja palisadnog tkiva i 2-3 sloja rastresitog sunderastog tkiva.



**Slika 4.9.** Poprečni presek lista *T. vulgare*. (A-C). CN-centralni nerv; E-epidermis; P-palisadni mezofil; S-sunderasti mezofil; GT-glandularna trihoma.

Na preseku lista uočene su mehaničke i glandularne trihome (Slika 4.9.). Mehaničke trihome su višćelijske. Biserijalne žlezdane trihome građene su od dve bazalne ćelije smeštene u epidermisu, dve kratke ćelije vrata i sekretorne glavice od 8 ćelija.

#### 4.4.3. Histoheмиjska bojenja za dokazivanje sekundarnih metabolita

Listovi *T. vulgare* gajeni *in vitro* tretirani su različitim histoheмиjskim bojama u cilju dokazivanja prisustva i lokalizovanja lipida, terpena, fenola, tanina, polisaharida, pektina i alkaloida u glandularnim trihomama (Tabela 4.1.).

**Tabela 4.1.** Bojene reakcije glandularnih trihoma lista *T. vulgare*.

Boja	Ciljana komponenta	Uočena obojenost	Reakcija*	
			Sekretorne ćelije	Subkutikularni prostor
<b>Hematoksilen-Sudan red 7B</b>	Ukupni lipidi	Narandžasto do roze	+	++
<b>Sudan black B</b>	Ukupni lipidi	Tamno plava do crna	++	++
<b>Sudan IV</b>	Ukupni lipidi	-	-	-
<b>Nil blue A</b>	Kiselinski i neutralni lipidi	Plava Crvena	-	++
<b>NADI</b>	Terpeni	Ljubičasto plava	+	++
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Fenolna jedinjenja	-	-	-
<b>Toluidin blue</b>	Fenolna jedinjenja	-	-	-
<b>PAS</b>	Neutralni polisaharidi	Crvena	+	+
<b>Ruthenium red</b>	Pektin	Roze	+	++
<b>Wagner</b>	Alkaloidi	Braon		
<b>Lugol</b>	Alkaloidi	-	-	-
<b>Dragendorf</b>	Alkaloidi	-	-	-
<b>Ellram</b>	Alkaloidi	-	-	-

\* - negativna reakcija; + slaba pozitivna reakcija; ++ jaka pozitivna reakcija

Na svežim presecima uočavaju se neobojene biserijadne trihomi sa sekretionim sadržajem u subkutikularnom prostoru (Slika 4.10.A).

Prisustvo lipida u žlezdanim trihomima dokazano je koriscenjem hematoksilen-Sudan red testa i Sudan Black B boje. Ovi testovi su pokazali prisustvo lipida u sekretornim ćelijama i subkutikularnom prostoru. (Slika 4.10., B i C).

Sekretorni produkt uocen u subkutikularnom prostoru boji se narandzasto-roze (Sudan 7B) ili svetlo do tamno plavo (Sudan black B) (Slika 4.10. D). Žlezdane trihomi nisu pokazale

pozitivnu reakciju na lipide bojenjem sa Sudan IV, kojom se boje ulja i slobodne masne kiseline.

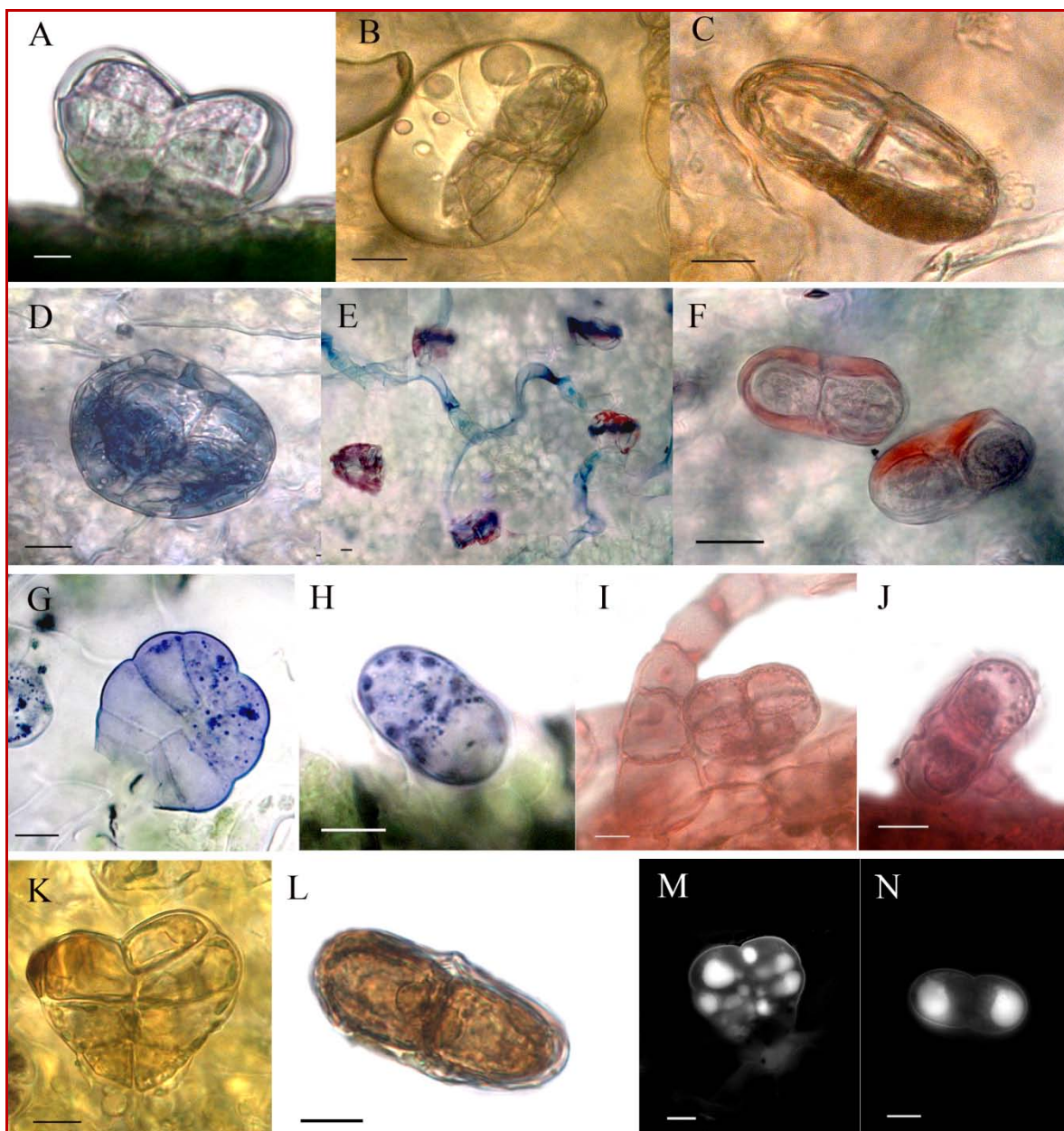
Primenom Nil blue A bojenja dobijena je pozitivna reakcija prisustvo kiselih i neutralnih lipida. U sekretornim ćelijama detektovani su kiseli lipidi (plava boja) dok je u subkutikularnom prostoru dokazano prisustvo neutralnih lipida (crvena boja) (Slika 4.10., E i F).

Terpeni u sekretornim ćelijama su identifikovani pomoći Nadi reagensa. Pozitivna reakcija na ovaj reagens ogledala se u plavoj do ljubičastoj boji kapljičnog i zrnastog materijala u subkutikularnom prostoru i u sekretornim ćelijama ukazujući na prisustvo etarskog ulja i smola (Slika 4.10., G i H).

FeCl<sub>3</sub> test i Toluidin Blue O su pokazali odsustvo fenola u zlezdanim trihomima *T. vulgare*.

PAS reakcija za bojenje polisaharida bila je pozitivna. Ova reakcija se ogledala u purpurno-crvenoj boji sekrecionog sadržaja koji ispunjava subkutikularni prostor kao i kapljica u samim sekretornim ćelijama (Slika 4.10., I i J). Takođe, ovom bojom su se obojili i nerastvorljivi ugljeni hidrati neglandularnih trihoma kao i polisaharidi drugih ćelija lista.

Tretiranjem Ruthenium crvenom dobijena je slaba reakcija u sekretornim ćelijama žlezdanih trihoma. Pored toga ovom bojom su se obojile i mehaničke trihome što dokazuje prisustvo pektina u njihovoj strukturi.



Slika 4.10. Histoheimska karakterizacija žlezdanih trihoma *T. vulgare*. (A) nebojena biserijatna trihoma sa vidljivim subkutikularnim prostorom; (B i C) pozitivna reakcija na hematoksilen-Sudan red 7B bojenje; (D) pozitivna reakcija na Sudan black B bojenje; (E i F) pozitivna reakcija na Nil blue bojenje; (G i H) pozitivna reakcija na NADI bojenje, (I i J) pozitivna reakcija na PAS bojenje: (K i L) pozitivna reakcija na bojenje Wagner reagensom. Bar=10  $\mu$ m.

Od bojenja korišćenih za detekciju alkaloida samo je bojenje Wagner reagensom dalo pozitivnu reakciju dok bojenja sa Lugol, Dragendorf i Ellram reagensom nisu ispoljila reakciju. Wagner reagens boji plavo škrob i saponine, braon alkaloidne, proteine i celulozu dok u žuto boji pektin, kutin i kalozu. U pozitivnoj reakciji sa Wagner reagensom prisutne su sve tri obojenosti (Slika 4.10. K i L).

Na svežim presecima listova *T. vulgare* koji su posmatrani fluorescentnim mikroskopom uočavala se plava autofluorescencija kapljičnog sadržaja unutar sekretornih ćelija (Slika 4.10., M i N).

#### **4.5. Hemijski sastav etarskog ulja i metanolnih ekstrakata**

Etarsko ulje *T. vulgare* izolovano je iz herbe biljaka iz prirode kao i iz herbe biljaka gajenih *in vitro*. Metanolni ekstrakti su pripremani odvojeno iz listova, cvetova, stabla i korena biljaka iz prirode kao i herbe i korenova biljaka gajenih u uslovima *in vitro*.

##### **4.5.1. Identifikacija i kvantifikacija komponenti etarskog ulja**

Nakon hidrodestilacije prinos etarskog ulja biljaka iz prirode je bio 0.32% (v/w). Ulje je imalo bledo žutu boju i karakterističan miris. Gasno-masenom analizom detektovano je 65 isparljivih komponenti koje su prikazane u Tabeli 4.2.

**Tabela 4.2.** Hemijski sastav etarskog ulja *T. vulgare* izolovanog iz herbe biljaka iz prirode.

#	Jedinjenje	KI <sup>e</sup>	KI <sup>l</sup>	% m/m	RRT	CI
1	<i>cis</i> -salven	845	847	0.02	0.360	1
2	<i>trans</i> -salven	860	858	0.06	0.368	1
3	triciklen	916	921	0.04	0.462	1
4	$\alpha$ -tujen	922	924	0.10	0.470	2
5	$\alpha$ -pinen	928	932	1.81	0.481	44
6	kamfen	942	946	0.46	0.505	11
7	tuja-2,4(10)-dien	949	953	0.03	0.515	1
8	sabinen	969	969	0.18	0.545	4
9	$\beta$ -pinen	971	974	0.17	0.551	4
10	dehidro-1,8-cineol	987	988	0.07	0.575	2
11	mesitilen	993	994	0.06	0.580	1
12	jomogi alkohol	999	999	0.20	0.590	5
13	<i>n.i.</i>	1001	-	0.04	0.611	1
14	$\alpha$ -terpinen	1010	1014	0.41	0.617	10
15	<i>p</i> -cimen	1013	1020	1.70	0.632	41
16	1,8-cineol	1021	1026	3.88	0.644	94
17	artemisia keton	1026	1056	2.94	0.694	71
18	<i>cis</i> -sabinene hidrat	1065	1065	0.17	0.709	4
19	artemisia alkohol	1083	1080	0.12	0.736	3
20	terpinolen	1084	1086	0.25	0.742	6
21	<i>trans</i> -sabinen hidrat	1097	1098	0.13	0.765	3
22	<i>cis</i> -tujon	1101	1101	5.28	0.776	128
23	<i>trans</i> -hrisantenol	1112	1096	12.51	0.791	302
24	<i>trans</i> -tujon	1114	1112	9.04	0.797	219
25	<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol	1119	1118	0.35	0.803	8
26	hrisantenon	1121	1124	0.40	0.809	10
27	<i>cis</i> -hrisantenol	1132	-	2.54	0.827	61
28	<i>trans</i> -pinokarveol	1136	1135	0.76	0.836	18
29	kamfor	1139	1141	4.90	0.845	119
30	<i>trans</i> -verbenol	1444	1140	0.08	0.866	2
31	pinokarvon	1158	1160	0.68	0.874	16
32	borneol	1164	1165	2.10	0.884	51
33	terpinen-4-ol	1175	1174	2.92	0.901	70
34	tuj-3-en-10-al	1183	1181	0.03	0.911	1
35	<i>p</i> -cimen-8-ol	1190	1179	0.12	0.917	3
36	$\alpha$ -terpineol	1191	1186	0.19	0.924	5
37	<i>cis</i> -piperitol	1195	1195	0.13	0.932	3

#	Jedinjenje	KI <sup>e</sup>	KI <sup>l</sup>	% m/m	RRT	CI
38	mirtenol	1197	1194	0.04	0.937	1
39	verbenon	1208	1204	0.08	0.948	2
40	<i>trans</i> -pulegol	1209	1213	0.19	0.954	5
41	<i>trans</i> -karveol	1215	1215	0.04	0.964	1
42	<b><i>trans</i>-hrisantenil acetat</b>	1236	1235	<b>41.37</b>	<b>1.000</b>	<b>1000</b>
43	<i>cis</i> -hrisantenil acetat	1258	1261	0.25	1.036	6
44	n.i.	1262	-	0.02	1.057	1
45	bornil acetat	1282	1287	0.74	1.077	18
46	<i>trans</i> -linalool oksid acetat (piranoid)	1284	1287	0.74	1.081	18
47	<i>trans</i> -sabinil acetat	1291	1289	0.03	1.086	1
48	n.i.	1294	-	0.03	1.096	1
49	Terpinen-4-ol acetat	1297	1299	0.11	1.100	3
50	n.i.	1306	-	0.04	1.115	1
51	<i>cis</i> -hrisantenil propionat	1322	1343	0.28	1.140	7
52	$\alpha$ -terpinil acetat	1347	1346	0.05	1.178	1
53	<i>cis</i> -karvil acetat	1363	1365	0.13	1.196	3
54	n.i.	1367	-	0.18	1.210	4
55	isobornil propanoat	1372	1383	0.02	1.221	1
56	n.i.	1458	-	0.06	1.385	2
57	germakren D	1476	1484	0.03	1.518	1
58	spatulanol	1575	1577	0.11	1.526	3
59	kariofilen oksid	1578	1582	0.15	1.534	4
60	salvial-4(14)-en-1-on	1590	1594	0.11	1.540	3
61	<i>trans</i> - $\beta$ -elemenon	1595	1602	0.07	1.548	2
62	Ledol	1605	1602	0.04	1.568	1
63	eremoligenol	1626	1699	0.09	1.598	2
64	n.i.	1647	-	0.05	1.632	1
65	neo-intermedeol	1655	1658	0.08	1.639	2

KI<sup>e</sup>-Kovačev indeks eksperimentalno određen

KI<sup>l</sup>-Kovačev indeks iz literature

% m/m-procentat komponente u etarskom ulju (masa/masa)

RRT-relativno retenciono vreme

CI-koncentracioni indeks

n.i.-nije identifikovano

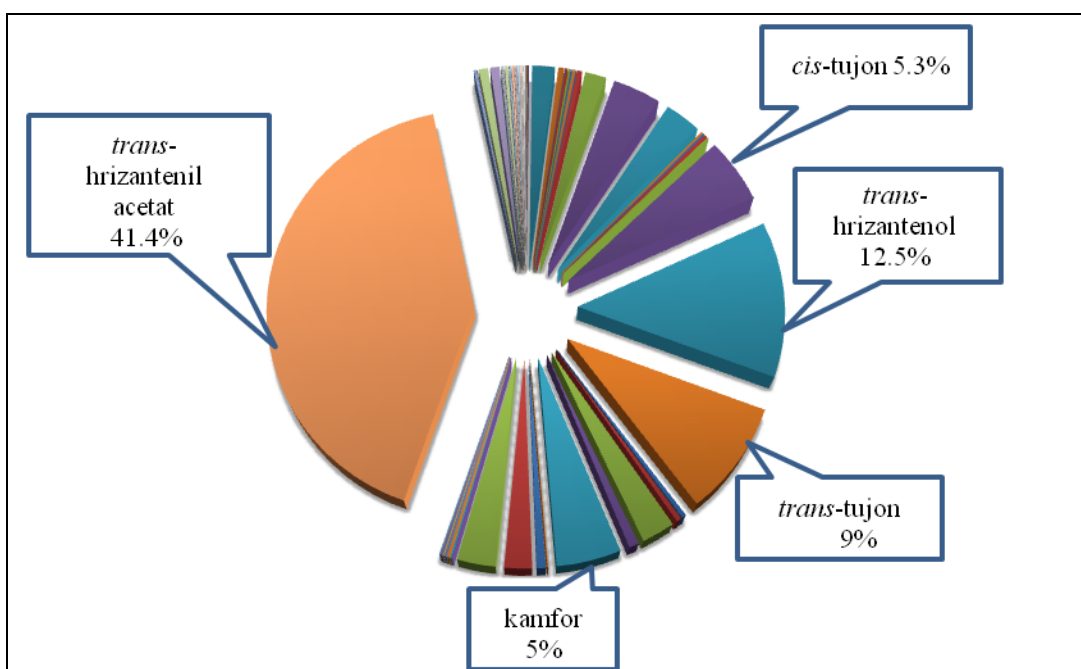
Identifikovano je 58 jedinjenja (Tabela 4.2.) koja su podeljena u 6 različitih grupa: oksidovani monoterpeni, monoterpenski ugljovodonici, oksidovani seskviterpeni, seskviterpenski ugljovodonici, aromatični ugljovodonici i aromatični alkoholi (Tabela 4.3.).



**Tabela 4.3.** Grupe hemijskih jedinjenja u etarskom ulju biljaka *T. vulgare* iz prirode i gajenim *in vitro*.

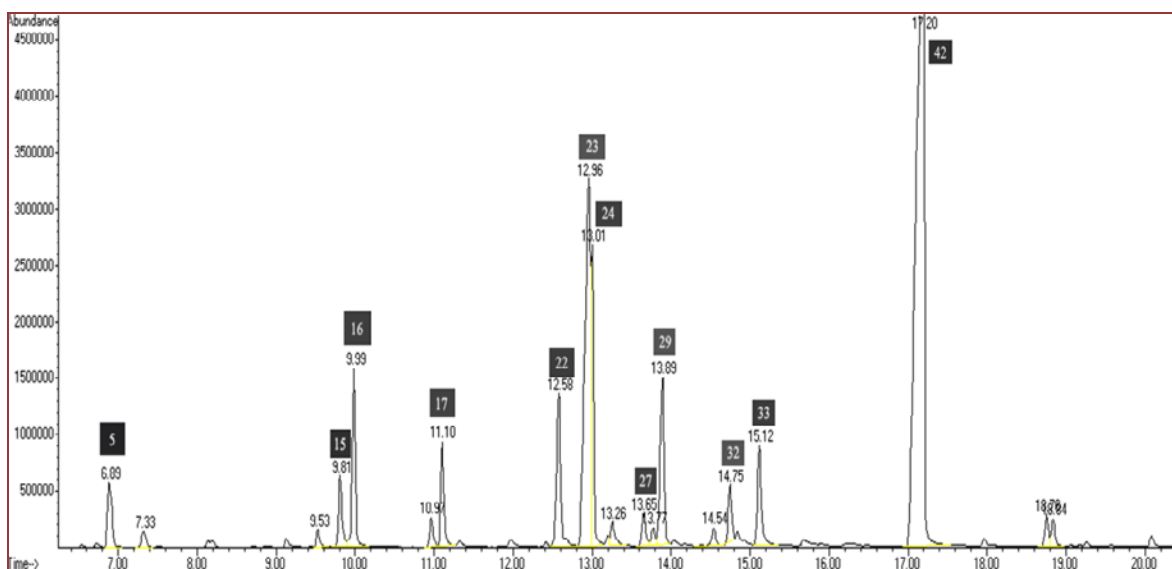
Grupe hemijskih jedinjenja	Biljke iz prirode (%)	<i>In vitro</i> biljke (%)
Oksidovani monoterpeni	93,5	38,5
Monoterpeni ugljovodonici	3,52	<0,7
Aromatični ugljovodonici	1,76	0,2
Oksidovani seskviterpeni	0,65	22,6
Seskviterpensi ugljovodonici	0,03	10,6

Najzastupljenija jedinjenja u sastavu etarskog ulja pripadaju oksidovanim monoterpenima i to: *trans*-hrizantenil acetat (41.37%), *trans*-hrizantenol (12.51%), *trans*-tujon (9.04%) i *cis*-tujon (5.28%) (Slika 4.11.). Na osnovu kvalitativnog i kvantitativnog sastava ulje je opisano kao *trans*-hrizantenil acetatni hemotip sa udelom *trans*-hrizantenil acetata sa preko 40% u ukupnom ulju.



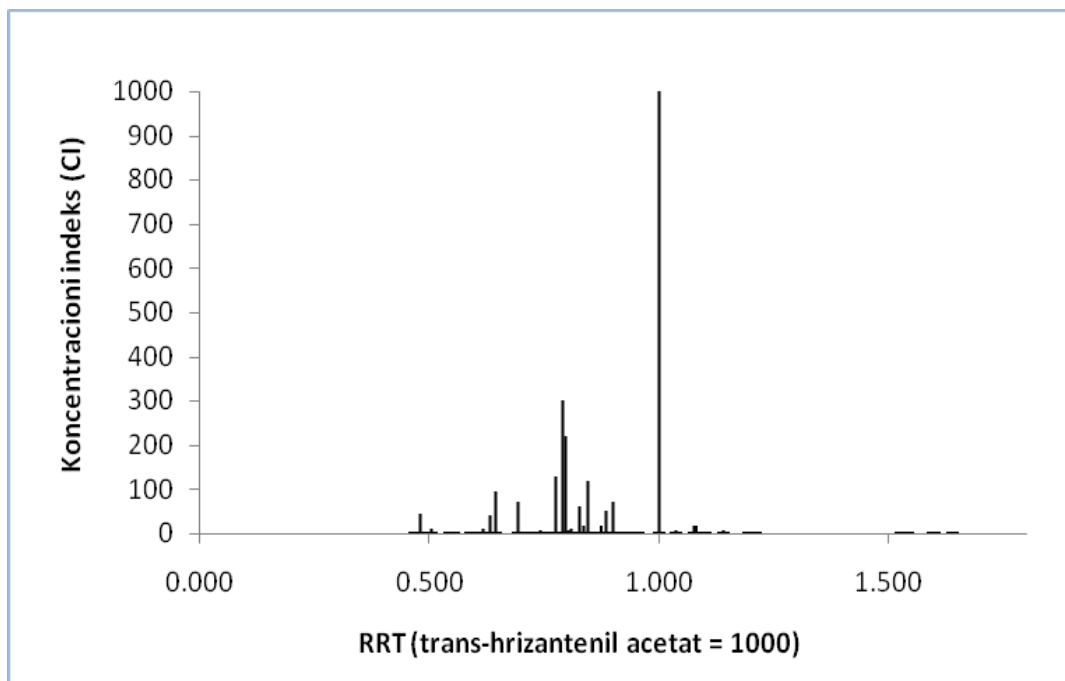
**Slika 4.11.** Udeo najzastupljenijih komponenti etarskog ulja *T. vulgare* izolovanog iz biljaka iz prirode.

Analizom GC/MS hromatograma etarskog ulja *T.vulgare* iz prirode uočeno je da se *trans*-hrisantenil acetat (pik br. 42; Rt=17,20 min) pojavljuje kao dominantno jedinjenje (Slika 4.12.). Pored njega detektovane su i značajno niže količine drugih oksidovanih monoterpena kao što su *trans*-hrizantenol (pik br. 23; Rt=12,96 min), *trans*-tujon (pik br. 24; Rt=13,01 min) i *cis*-tujon (pik br. 22; Rt=12,58 min), kamfor (pik br. 29; Rt=13,89 min) i 1,8-cineol (pik br. 16; Rt=9,99 min).

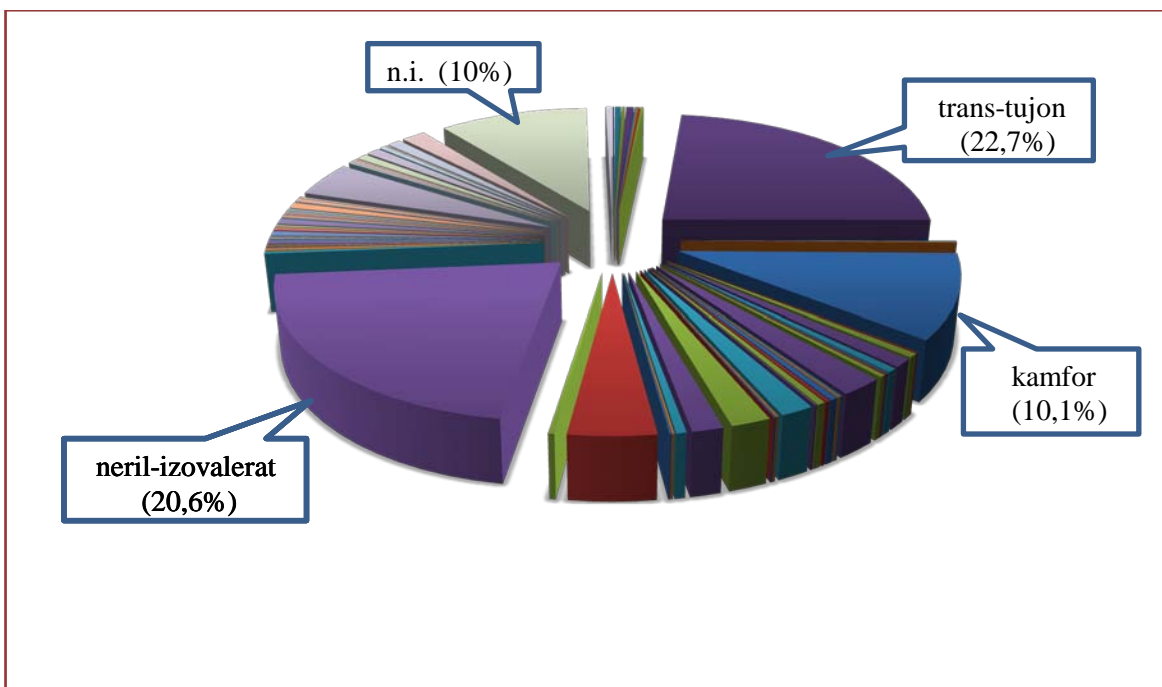


**Slika 4.12.** GC/MS hromatogram etarskog ulja biljaka *T.vulgare* iz prirode.

Za određivanje relativne zastupljenosti pojedinačnih komponenti u etarskom ulju, hromatogrami su normalizovani tako što je dominantnom jedinjenju, *trans*-hrisantenil acetatu dodeljena vrednost koncentracionog indeksa CI=1000 (Slika 4.13.). Vrednosti za parametare RRT koji predstavlja relativno retenciono vreme odgovarajuće komponente u odnosu na odabranu referentnu komponentu prikazane su u Tabelama 4.2. i 4.3.



**Slika 4.13.** Normalizovani GC/MS hromatogram etarskog ulja biljaka *T. vulgare* iz prirode.



**Slika 4.14.** Udeo najzastupljenijih komponenti u etarskom ulju biljaka *T. vulgare* gajenih *in vitro*.

Gasno-masenom analizom etarskog ulja biljaka *T. vulgare* gajenih *in vitro* detektovano je 88 isparljivih jedinjenja od kojih je 42 identifikovano, što predstavlja 72,3% ukupnog sadržaja ulja dok su samo 4 komponente zastupljene sa preko 5% (Tabela 4.3). U ukupnom sadržaju etarskog ulja sa 40% su zastupljeni monoterpeni a sa 33,4% seskviterpeni, dok je 14 jedinjenja zastupljeno u tragovima (< 0,1%). Dva jedinjenja koja određuju hemotip i dominiraju u etarskom ulju *in vitro* biljaka su oksidovani monoterpen *trans*-tujon (22,7%) i oksidovani seskviterpen neril izovalerat (20,6%). Pored njih 10,1% sadržaja etarskog ulja je činio kamfor. Identifikovana jedinjenja mogu se podeliti u 6 različitih grupa i to oksidovane monoterpeni, monoterpenske ugljovodonike, oksidovane seskviterpene, seskviterpenske ugljovodonike, aromatične ugljovodonike i aromatične alkohole (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3.** Hemijski sastav etarskog ulja *T. vulgare* izolovanog iz herbe biljaka gajenih *in vitro*.

#	Jedinjenje	KI <sup>e</sup>	%m/m	RRT	CI
1	triciklen	919	Tr.	0.456	< 4
2	$\alpha$ - tujen	921	Tr.	0.460	<4
3	$\alpha$ - pinen	932	Tr.	0.481	< 4
4	kamfen	946	0.1	0.514	< 4
5	sabinen	971	0.4	0.571	18
6	$\beta$ - pinen	974	Tr.	0.580	< 4
7	dehidro-1,8 cineol	986	Tr.	0.614	< 4
8	$\alpha$ -terpinen	1010	Tr.	0.686	< 4
9	<i>p</i> -cimen	1023	0.2	0.706	9
10	1,8 cineol	1029	0.5	0.725	22
11	$\gamma$ - terpinen	1057	0.1	0.809	4
12	<i>cis</i> -sabinen hidrat	1065	0.1	0.834	4
13	terpinolen	1086	Tr.	0.905	< 4
14	n.i.	1099	0.1	0.935	4
15	<i>cis</i> -tujon	1106	0.2	0.960	9
<b>16</b>	<b><i>trans</i>-tujon</b>	<b>1117</b>	<b>22.7</b>	<b>1.000</b>	<b>1000</b>
17	n.i.	1133	0.1	1.059	4
18	<i>trans</i> - pinokarveol	1135	0.1	1.075	4
19	kamfor	1142	10.1	1.093	445
20	n.i.	1154	0.1	1.133	4
21	<i>cis</i> - hrizantenol	1160	0.5	1.157	22
22	borneol	1163	1.0	1.167	44
23	terpinen 4-ol	1175	0.5	1.210	22
24	n.i.	1183	Tr.	1.238	< 4
25	$\alpha$ - terpineol	1088	0.1	1.260	4
26	n.i.	1108	0.1	1.330	4
27	bornil acetat	1284	0.3	1.610	13
28	neril acetat	1364	2.1	1.901	93
29	n.i.	1375	0.1	1.942	4
30	modheph-2-ene	1379	0.1	1.956	4
31	$\alpha$ -isocomene	1385	0.4	1.981	18
32	$\beta$ -isocomene	1405	0.2	2.051	9
33	kariofilen	1419	0.4	2.100	18
34	$\alpha$ -humulen	1453	0.1	2.221	4
35	$\beta$ -farnezen	1457	1.6	2.234	70
36	amorpha 4,7-dien	1460	0.1	2.245	4
37	<i>cis</i> -Muurola-4(14),5-diene	1463	0.1	2.255	4
38	n.i.	1476	Tr.	2.299	<4
39	germakren d	1481	1.9	2.320	84
40	himačalen gama	1484	1.5	2.328	66
41	$\beta$ -jonon E	1487	0.5	2.328	22
42	Biciklogemakren	1497	0.1	2.373	4
43	$\gamma$ -Z -bisabolen	1517	0.1	2.441	4
44	$\beta$ -seskvifelandren	1525	4.2	2.469	185
45	spatulenol	1577	0.3	2.651	13
<b>46</b>	<b>neril izovalerat</b>	<b>1585</b>	<b>20.6</b>	<b>2.676</b>	<b>907</b>
47	n.i. ms	1589	0.3	2.690	13
48	salvial-4(14)-en-1-on	1593	0.3	2.706	13
49	n.i. ms	1597	0.1	2.718	4
50	n.i.	1603	0.1	2.737	4
51	n.i. ms	1605	0.1	2.746	4
52	n.i. ms	1609	0.5	2.755	22
53	n.i. ms	1613	0.2	2.771	9
54	n.i. ms	1618	0.1	2.788	4

#	Jedinjenje	KI <sup>e</sup>	% m/m	RRT	CI
55	n.i. ms	1830	0.6	2.824	26
56	n.i. ms	1634	0.4	2.839	18
57	n.i. ms ili gossonorol	1638	0.2	2.849	9
58	n.i. ms	1655	0.7	2.902	31
59	n.i. ms	1658	0.1	2.912	4
60	n.i.	1659	0.2	2.928	9
61	n.i.	1667	0.1	2.939	4
62	n.i. ms	1672	0.2	2.959	9
63	n.i. ms	1675	0.1	2.967	4
64	n.i. ms	1680	0.1	2.982	4
65	n.i. ms	1686	0.2	3.004	9
66	n.i. ms	1689	0.7	3.013	31
67	n.i.	1714	0.1	3.090	4
68	n.i.	1716	Tr.	3.098	< 4
69	n.i.	1719	Tr.	3.105	< 4
70	n.i.	1721	Tr.	3.112	< 4
71	n.i.	1724	Tr.	3.121	< 4
72	n.i. ms	1730	0.3	3.137	13
73	n.i.	1733	Tr.	3.147	< 4
74	n.i.	1751	0.1	3.202	4
75	n.i.	1753	0.1	3.209	4
76	n.i. ms	1768	4.2	3.251	185
77	n.i. ms	1776	0.2	3.279	9
78	n.i. ms	1781	0.2	3.299	9
79	n.i.	1791	0.1	3.326	4
80	n.i.	1825	0.1	3.423	4
81	2-pentadekanon 6,10,14 tri metil	1845	0.7	3.480	31
82	n.i. ms	1901	0.9	3.650	40
83	n.i. ms	1920	0.4	3.694	18
84	metil heksanoat	1927	0.1	3.713	4
85	n.i. ms	1953	0.9	3.788	40
86	n.i. ms	1974	1.6	3.849	70
87	n.i. ms	1997	10.0	3.921	441
88	n.i. ms	2028	0.4	3.989	18
	Ukupno		97.4		
	n.i.		25.1		

KI<sup>e</sup>-Kovačev indeks eksperimentalno određen

% m/m-procentat komponente u etarskom ulju (masa/masa)

RRT-relativno retenciono vreme

CI-koncentracioni indeks

n.i-nije identifikovano

Tr-jedinjenje prisutno u tragovima (< 0,1%)

#### **4.5.2. Identifikacija i kvantifikacija komponenti metanolnih ekstrakata**

LC-DAD/ESI-TOF-MS analizom kao i HPLC analizom identifikovane su komponente metanolnih ekstrakata različitih delova *T. vulgare* sakupljenih iz prirode i gajenih u *in vitro* uslovima.

U metanolnim ekstraktima različitih delova biljaka sakupljenih iz prirode detektovano je 36 jedinjenja, od čega je tentativno identifikovano 25 (Tabela 4.4.). Pokazano je da su fenolne kiseline i flavonoidi, zajedno sa njihovim derivatima glavne komponente metanolnih ekstrakata.

Tabela 4.4. LC-DAD/ESI-TOF-MS karakterizacija komponenti metanolnih ekstrakata *T. vulgare* iz prirode.

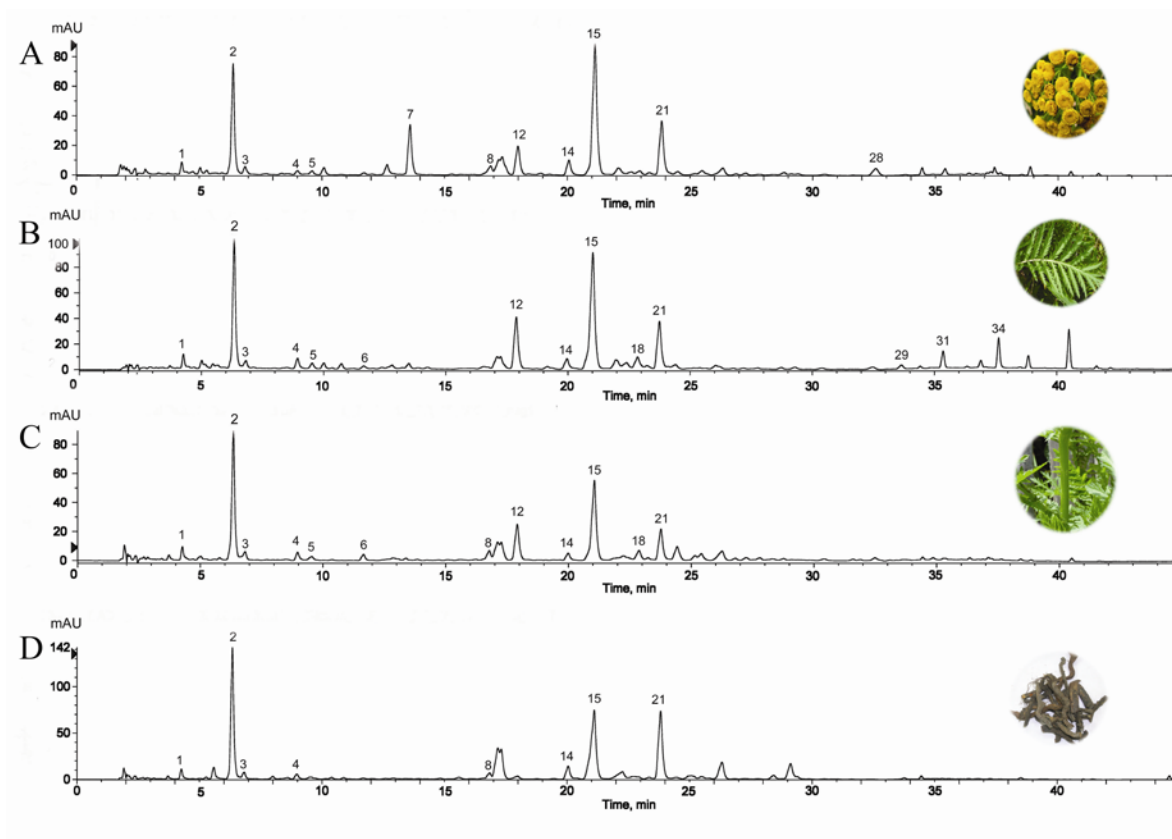
#	UV max (nm)	Jonske mase (m/z)	Molekulska formula	Jedinjenje
1	240; 292; sh; 326	353.0822; 354.0907; 389.0666	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	1-kafeoilhinska kiselina
2	244; sh 292; 326	353.0875; 354.0902; 389.0635; 390.0672; 399.0925; 400.0960; 707.1815; 743.1561	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Neohlorogena kiselina
3	244; sh296; 326	353.0870; 354.0906; 399.0936; 707.1808	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Hlorogena kiselina
4	244; sh294; 318	353.0872; 354.0907; 355.0928; 389.0619; 707.1832; 708.1866	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Kriptohlorogena kiselina
5	272; 322	593.1503; 594.1543; 629.1218	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	Saponarin
6	242; sh290; 326	367.1027; 368.1068; 403.0795; 413.1090; 735.2145	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	Kafeoilmetil hinska kiselina
7	250; 344	463.0870; 464.0907; 499.0642; 500.0684; 509.0931; 510.0968	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	Izokvercetin
8	254; 370	477.0668; 478.0704; 513.0459; 523.0718	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	Mikvelinjin
9	256; sh272; 372	477.0666; 478.0702; 513.0430; 523.0727	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	Gospetin -8-O-glukozid
10	226; 284; 340	463.0867; 464.0901; 465.0930	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	Kvercetin-O-glukozid
11	228; 284; 336	463.0868; 464.0904; 465.0930	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	Kvercetin-O-glukosid
12	254; sh268; 350	447.0910; 448.0947; 483.0666; 493.0970; 895.1887	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	Luteolin-7-glukozid
13	254; sh272; 348	461.0701; 462.0735; 497.0467; 507.0757; 923.1461	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	Luteolin-7-O-glukuronid
14	244; sh292; 326	353.1186; 516.1226; 1031.2471; 1032.2511	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	3,4-O-dikafeoilhinska kiselina
15	242; sh292; 326	515.1187; 516.1217; 517.1243	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	3,5-O-dikafeoilhinska kiselina
16	242; sh292; 322	515.1180; 516.1222; 551.0952; 552.0994	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	4,5-O-dikafeoilhinska kiselina
17	264; 326	461.0718; 462.0752; 497.0480; 507.0780	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	Skutelarin
18	256; sh268; 354	447.1029; 478.1065; 513.0818	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	Petunidin-3-O-glukozid
19	266; 336	445.0767; 446.0806; 481.0534; 891.1628	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	Baikalin
20	242; sh290; 326	469.1185; 515.1193; 516.1219; 517.1244	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	ni
21	244; sh294; 328	515.1184; 516.1217; 1031.2444; 1032.2483	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	Dikafeoilhinska kiselina
22	254; sh 268; 354	475.0872; 476.0908; 521.0951; 951.1824	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	ni



#	UV max (nm)	Jonske mase (m/z)	Molekulska formula	Jedinjenje
23	266,344	475.0875; 476.0912; 511.0642; 521.0939	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	ni
24	236; 294; 324	461.1082; 462.1123; 497.0856	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	ni
25	228; 284	477.1025; 478.1062; 513.0797; 955.2156	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	ni
26	254; sh272;356	505.0975; 506.1011; 541.0762	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	ni
27	256; sh279;356	505.0974; 506.1011; 541.0750	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	ni
28	254; 264; 348	285.0398; 286.0435; 321.0184; 331.0477; 571.0880	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	Luteolin
29	256;272;346	315.0505; 316.538; 351.0262	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Nepetin
30	242; sh292; 328	667.1503; 678.1539; 1355.3087; 1356.3113	C <sub>34</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	3,4,5-trikafeoilhinska kiselina
31	256; sh274;352	345.0606; 346.0640; 381.0378; 391.0667	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	Kvercetagetin-3,6-dimetetar
32	266; 336	269.0453; 270.0482; 271.0511	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	Apigenin
33	274; 336	299.0554; 300.0590; 335.0331; 345.0606	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Hispidin
34	274; 344	329.0661; 330.0695; 365.0433; 375.0713	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	Eupalitin
35	256; 350	359.0762; 360.0801; 405.0865	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	ni
36	274; 342	297.0795; 343.0814; 344.0847	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	ni

Podatke identifikovano

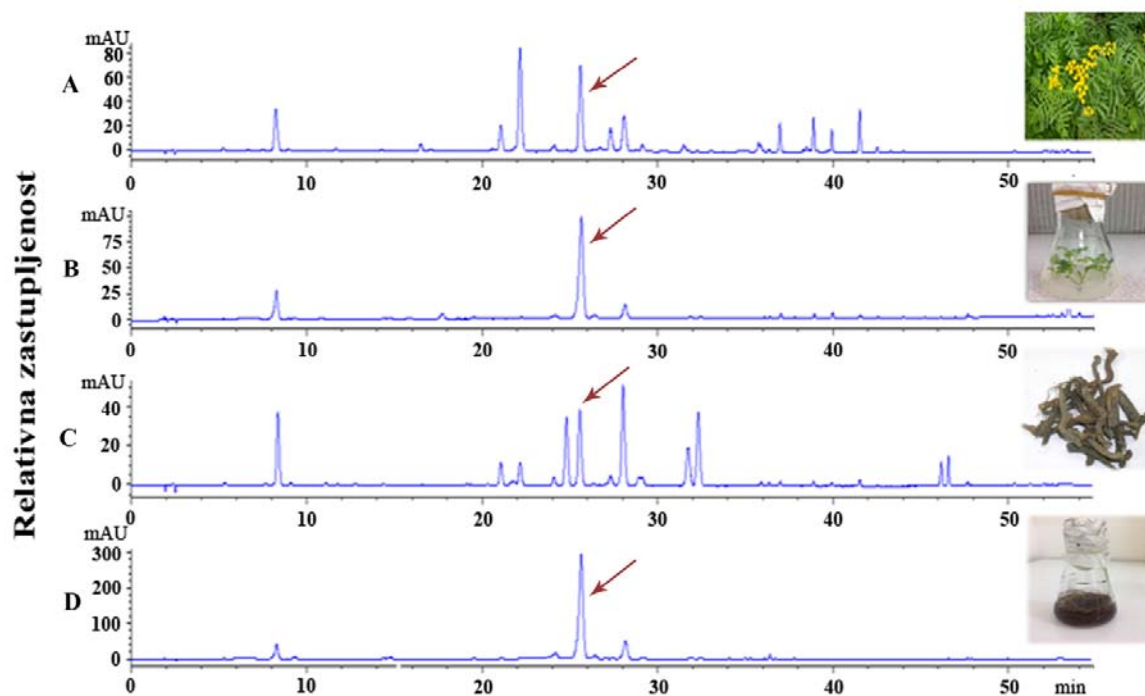
Karakteristični hromatogrami metanolnih ekstrakata cveta, lista, stabla i korena biljaka iz prirode prikazani su na slici 4.14. Fenolne kiseline su zastupljene sa derivatima hidroksicimete kiseline koji su detektovani u svim ispitivanim metanolnim ekstraktima (Slika 4.14.). Najzastupljenija jedinjenja iz ove grupe su neohlorogena (pik br. 2), 3,5-*O*-dikafeoilhininska (pik br. 15) i dikafeoilhininska kiselina (pik br. 21). Metanolni ekstrakti različitih delova biljke sadrže različite relativne količine ovih kiselina. Tako, neohlorogena i dikafeoilhininska kiselina imaju najveći relativni udeo u metanolnom ekstraktu korena dok su u drugim ekstraktima njihove relativne količine za 40-50% umanjene. S druge strane, 3,5-*O*-dikafeoilhininska kiselina je sa sličnom zastupljenošću prisutna u svim metanolnim ekstraktima. Pored fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima *T.vulgare* je detektovano i 17 flavonoida. Većina flavonoida je prisutna u svim metanolnim ekstraktima dok su pojedini detektovani samo u ekstraktima određenih delova biljke. Tako su izokvercetin (pik br. 7) i luteolin detektovani samo u metanolnom ekstraktu cveta dok je luteolin-7-glukozid (pik br. 12) bio prisutan u svim ekstraktima osim u metanolnom ekstraktu korena. Interesantno je da je grupa od 8 flavonoida sa najvećim retencionim vremenom detektovana u metanolnim ekstraktima cveta i lista, ali je njihova relativna količina bila značajna samo u ekstraktu lista. Udeo nepetina (pik br. 29), kvercetagetin-3,6-dimetiletra (pik br. 31), hispidulina (pik br. 33) i eupalitina (pik br. 34) je bio je primetan samo u metanolnom ekstraktu lista.



**Slika 4.14.** Hromatogrami metanolnih ekstrakata (A) cveta, (B) lista, (C) stabljike i (D) korena biljaka *T. vulgare* sakupljenih iz prirode i analiziranih LC-DAD/ESI-TOF-MS. Broj pika odgovara broju identifikovanog jedinjenja u tabeli 4.4.

Za analizu i poređenje hemijskog sastava komponenti metanolnih ekstrakata herbe i korena biljaka *T. vulgare* iz prirode i gajenih *in vitro* korišćena je tečna hromatografija pod visokim pritiskom. Poređenjem hromatograma (detekcija na 280 nm) uočava se da se metanolni ekstrakti herbe i korena biljaka *T. vulgare* iz prirode i gajenih *in vitro* razlikuju po hemijskom sastavu (Slika 4.15.). Očigledna je i razlika u relativnoj zastupljenosti hemijskih komponenti u ovim ekstraktima. Na osnovu karakterističnih UV spektara, u svim ekstraktima je utvrđeno prisustvo flavonoida i fenolnih kiselina, a koinjektiranjem sa standardom identifikovana je 3,5-*O*-dikafeoilhininska kiselina. Na prikazanim hromatogramima uočava se da je relativna zastupljenost 3,5-*O*-dikafeoilhininske kiseline u

ekstraktu korena *T. vulgare* gajenog *in vitro* 7 puta veća nego u metanolnom ekstraktu korena iz prirode i 5 puta veća nego u metanolnom ekstraktu herbe *T. vulgare* iz prirode.



**Slika 4.15.** Hromatogrami metanolnih ekstrakata *T. vulgare* analizirani HPLC metodom. Metanolni ekstrakt (A) herbe iz prirode; (B) herbe dobijene *in vitro*; (C) korena *T. vulgare* iz prirode; (D) korena dobijenog *in vitro*. Strelica pokazuje pik 3,5-*O*-dikafeoilhininske kiseline.

#### 4.5.3. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima

Količina ukupnih fenolnih jedinjenja prisutnih u metanolnim ekstraktima *T. vulgare* određena je spektrofotometrijski korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa. Sadržaj ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima korena, lista, cveta i stabljike *T. vulgare* se statistički značajno razlikovao u sva četiri analizirana ekstrakta. Najveća količina detektovana je u metanolnom ekstraktu korena a najniža u ekstraktu stabljike (Tabela 4.5.).

#### 4.5.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH testom i testom redukujućeg potencijala

DPPH test korišćen je za određivanje antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata. Ovom metodom određuje se sposobnost jedinjenja u ekstraktu da doniraju vodonikov atom što dovodi do sparivanja elektrona u molekulu DPPH i smanjenja apsorpcije ovog jedinjenja na 517 nm.

U Tabeli 4.5. su prikazane  $IC_{50}$  vrednosti koje predstavljaju koncentraciju ekstrakta potrebnu za neutralizaciju 50% DPPH radikala kao i vrednosti za Trolox koji je korišćen kao pozitivna kontrola.

$IC_{50}$  vrednost je iznosila od 44 do 80,3  $\mu\text{g/mL}$  a značajan antioksidativni kapacitet ispoljio su metanolni ekstrakti korena (44  $\mu\text{g/mL}$ ) i cveta (58,3  $\mu\text{g/mL}$ ). Sa druge strane najmanju antioksidativnu aktivnost ovim testom pokazao je metanolni ekstrakt stabljike (80,3  $\mu\text{g/mL}$ ). Poređenjem  $IC_{50}$  vrednosti i sadržaja ukupnih fenola može se primetiti da antioksidativni kapacitet odgovara sadržaju ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima. Metanolni ekstrakt korena u kome je određen najveći sadržaj ukupnih fenola ispoljio je najveću antioksidativnu aktivnost DPPH testom. *Pearson* koeficijent korelacije između sadržaja ukupnih fenola i  $IC_{50}$  vrednost pokazao je snažnu negativnu korelaciju ( $R = -0,8$ ) sa koeficijentom determinacije  $R^2 = 0,64$ .

**Tabela 4.5.** Sadržaj ukupnih fenola, antioksidativna aktivnost izražena DPPH testom ( $IC_{50}$ ) i testom redukujućeg potencijala (RP).

ME	Ukupni fenoli (mgGAE/g)	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	RP ( $A_{700}$ )				
			0.1 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	0.75 mg/mL	1 mg/mL
koren	221,7 $\pm$ 12,51 <sup>a</sup>	44 $\pm$ 0,57 <sup>c</sup>	0,123 $\pm$ 0,005 <sup>b</sup>	0,363 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup>	0,602 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>	0,796 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>	0,903 $\pm$ 0,015 <sup>a</sup>
list	112,6 $\pm$ 8,12 <sup>b</sup>	77 $\pm$ 8,18 <sup>a</sup>	0,029 $\pm$ 0,002 <sup>d</sup>	0,269 $\pm$ 0,001 <sup>c</sup>	0,451 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>	0,62 $\pm$ 0,007 <sup>c</sup>	0,681 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>
cvet	96,2 $\pm$ 1,53 <sup>c</sup>	58,3 $\pm$ 2,33 <sup>b</sup>	0,114 $\pm$ 0,009 <sup>bc</sup>	0,243 $\pm$ 0,003 <sup>d</sup>	0,431 $\pm$ 0,03 <sup>cd</sup>	0,494 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,598 $\pm$ 0,013 <sup>c</sup>
stabljika	83,6 $\pm$ 2,07 <sup>d</sup>	80,3 $\pm$ 2,33 <sup>a</sup>	0,109 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	0,237 $\pm$ 0,002 <sup>d</sup>	0,407 $\pm$ 0,011 <sup>d</sup>	0,551 $\pm$ 0,004 <sup>d</sup>	0,649 $\pm$ 0,012 <sup>d</sup>
Trolox	/	17,46 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	0,346 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,549 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,824 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,92 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,926 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>

Vrednosti u koloni obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ( $P \leq 0,005$ ) prema LSD testu.

Testom redukujuće aktivnosti se određuje sposobnost antioksidanata iz ekstrakta da budu donori elektrona i redukuju feri ( $\text{Fe}^{3+}$ )jon u fero ( $\text{Fe}^{2+}$ )jon što dovodi do povećanja apsorpcije na talasnoj dužini od 700 nm. Povećana apsorpcija ukazuje na povećanu redukujuću aktivnost.

Rezultati su pokazali da redukujući potencijal metanolnih ekstrakata korena, lista, cveta i stabljike *T. vulgareraste* sa povećanjem koncentracije ekstrakta (Tabela 4.5.).

Najveći redukujući potencijal u svim primenjenim koncentracijama ispoljio je metanolni ekstrakt korena. Ovaj ekstrakt je u koncentraciji od 1 mg/mL ispoljio redukujući potencijal koji se statistički značajno ne razlikuje od redukujućeg potencijala Troloxa u istoj koncentraciji. *Pearson* koeficijent korelacije između sadržaja ukupnih fenola i redukujućeg potencijala ispitivanih metanolnih ekstrakata potvrdio je jaku pozitivnu korelaciju sa koeficijentom korelacije  $R=0,89$  i koeficijentom determinacije  $R^2=0,79$ .

#### 4.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata i etarskog ulja *T. vulgare* ispitivana je mikrodilucionim metodom na odabrane vrste bakterija i mikromiceta. Prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti određene su minimalne inhibitorne (MIK) kao i minimalne baktericidne (MBK) odnosno minimalne fungicidne koncentracije (MFK) analiziranih metanolnih ekstrakata i etarskog ulja. Ove vrednosti poređene sa dva referentna antibiotika odnosno antimikotika izražene su u mg/mL prikazane su u tabeli 4.6. Pri interpretaciji rezultata antimikrobne aktivnosti etarskog ulja i metanolnih ekstrakata, korišćen je sledeći kriterijum:  $\text{MIK} < 1 \text{ mg/ml}$  jaka aktivnost,  $1 \text{ mg/ml} < \text{MIK} < 10 \text{ mg/ml}$  umerena aktivnost,  $\text{MIK} > 10 \text{ mg/ml}$  slaba aktivnost (Lako, 2013).

Etarsko ulje *T. vulgare* ispoljilo je jako antimikrobno dejstvo prema većini ispitivanih bakterijskih (5 od analiziranih 8) i svim vrstama mikromiceta (Tabela 4.6.). MIK za bakterije kretale su se u rasponu od 0,03-8,47 mg/mL, dok se MBK kretala u intervalu od 0,42-16,93 mg/mL. Kada se vrednosti MIK i MBK etarskog ulja uporede sa istim vrednostima referentnih antibiotika uočava se da je etarsko ulje pokazalo niže MIK nego

referentni antibiotici prema *E. coli* i *E. cloacae*. MBK etarskog ulja (0,42 mg/mL) je takođe bila niža od MBK referentnih antibiotika (0,52mg/mL i 0,74 mg/mL za Streptomycin i Ampicilin) prema *E. cloacae*. Antibakterijska aktivnost je bila jaka i prema *S. aureus* (MIK-0,21 mg/mL, MBK-0,85mg/mL), *B. cereus* (MIK-0,21 mg/mL, MBK-0,85mg/mL) i *M. flavus* (MIK-0,64 mg/mL, MBK-0,85 mg/mL). Iako je etarsko ulje ispoljilo slabiju aktivnost prema *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* i *S. thyphimurium* nego referentni antibiotici vrednosti MIK nalaze se u opsegu od 1-10 mg/mL što ukazuje na umerenu antibakterijsku aktivnost. Vrste *L. monocytogenes* i *P. aeruginosa* su pokazali najveću rezistentnost prema dejstvu etarskog ulja *T. vulgare*.

Etarsko ulje *T. vulgare* ispoljilo je jaku antifungalnu aktivnost prema većini ispitivanih vrsta mikromiceta. MIK su se kretale u rasponu od 0,002-0,42 mg/mL dok su MFK bile u opsegu od 0,003-0,51 mg/mL, osim za *T. viride* gde je vrednost MFK bila prilično visoka u odnosu na MFK referentnih antimikotika i iznosila je 8,47 mg/mL. U odnosu na referentne antimikotike etarsko ulje je pokazalo jaču ili sličnu aktivnost prema većini ispitivanih gljiva, posebno u odnosu na antimikotik Ketokonazol. Veoma jaku aktivnost etarsko ulje ispoljilo je na vrste *Penicillium*. Posebno osetljivavrstu bila je *P. funiculosum* gde je koncentracija etarskog ulja od 0,002 mg/mL delovala fungistatično dok je koncentracija od 0,003 mg/mL pokazala fungicidan efekat. Ove vrednosti MIK i MFK su i preko 100 puta niže u odnosu na iste vrednosti referentnih antimikotika (0,2-0,5 mg/mL). Kao vrlo osetljivena dejstvo etarskog ulja pokazali su se i patogene mikromicete *A. ochraceus* i *A. fumigatus* čiji rast je bio inhibiran koncentracijom etarskog ulja od 0,05 i 0,13 mg/mL.



Tabela 4.6. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja i metanolnih ekstrakata stabljike, lista, cveta i korena *T. vulgare*.

Bakterije	MIK/MBK (mg/mL)													
	EU	ME stabla	ME list	ME cvet	ME koren	Streptomycin	Ampicilin							
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,21 d	0,85 d	0,09 c	0,18 b	0,05 b	0,09 a	0,05 b	0,09 a	0,09 c	0,18 b	0,04 a	0,09 a	0,25 d	0,37 c
<i>Bacillus cereus</i>	0,21 d	0,85 d	0,09 c	0,18 b	0,05 b	0,09 a	0,02 a	0,09 a	0,09 c	0,18 b	0,09 c	0,17 b	0,25 d	0,37 c
<i>Micrococcus flavus</i>	0,64 f	0,85 d	0,09 c	0,18 b	0,05 b	0,09 a	0,02 a	0,09 a	0,09 c	0,18 b	0,17 cd	0,34 c	0,25 e	0,37 c
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,12 e	16,93 d	0,38 c	0,75 b	0,38 c	0,75 b	0,02 a	0,75 b	0,75 d	1,5 c	0,17 b	0,34 a	0,37 c	0,49 ab
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,47 e	16,93 f	0,38 c	0,75 c	0,38 c	0,94 d	0,18 b	0,38 b	0,09 a	0,18 a	0,17 b	0,34 b	0,74 d	1,24 e
<i>Salmonella typhimurium</i>	2,12 c	8,47 c	0,38 b	0,75 b	0,18 a	0,38 a	0,18 a	0,38 b	0,38 b	0,75 b	0,17 a	0,34 a	0,37 b	0,49 ab
<i>Escherichia coli</i>	0,03 a	0,53 d	0,18 c	0,38 b	0,18 c	0,38 b	0,09 b	0,18 a	0,18 c	0,38 b	0,17 c	0,34 b	0,25 d	0,49 c
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,11 ab	0,42 bc	0,38 d	0,75 d	0,18 b	0,38 b	0,09 a	0,18 a	0,18 b	0,38 b	0,26 c	0,52 c	0,37 d	0,74 d
Gljive	MIK/MBK (mg/mL)Bitonazol										Ketokonazol			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,13 a	0,51 c	0,13 a	0,45 b	0,13 a	0,23 a	0,23 b	0,45 b	0,13 a	0,23 a	0,15 ab	0,2 a	0,2 b	0,5 c
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,11 bc	0,21 b	0,03 a	0,06 a	0,15 c	0,3 c	0,08 b	0,3 c	0,15 c	0,6 d	0,1 bc	0,2 b	0,2 d	0,5 cd
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,05 a	0,21 a	0,3 c	0,6 c	0,15 b	0,6 c	0,15 b	0,3 b	0,15 b	0,6 c	0,15 b	0,2 a	1,5 d	2 d
<i>Aspergillus niger</i>	0,25 d	0,51 c	1 e	2 d	0,13 b	0,23 b	0,13 b	0,23 b	0,02 a	0,03 a	0,15 b	0,2 b	0,2 c	0,5 c
<i>Trichoderma viride</i>	0,42 d	8,47 d	0,03 a	0,23 a	0,3 c	0,6 b	0,15 b	0,6 b	0,3 c	0,6 b	0,15 b	0,2 a	1 e	1 c
<i>Penicillium funiculosum</i>	0,002 a	0,003 a	0,04 b	0,15 b	0,04 b	0,15 b	0,03 ab	0,45 e	0,04 b	0,3 d	0,2 c	0,25 c	0,2 c	0,5 f
<i>Penicillium ochrochloron</i>	0,11 a	0,22 a	0,3 c	0,6 c	0,3 c	0,6 c	0,15 a	0,3 b	0,3 c	0,6 c	0,2 b	0,25 ab	2,5 d	3,5 d
<i>Penicillium verrucosum</i>	0,11 b	0,22 bc	0,23 c	0,45 d	0,13 b	0,23 bc	0,13 b	0,23 bc	0,02 a	0,03 a	0,1 b	0,2 b	0,2 c	0,3 c

Vrednosti MIK, MBK, MFK u koloni obeležene istim slovom nisu statistički značajno različite ( $P \leq 0,005$ ) prema LSD testu.

Metanolni ekstrakti korena, lista, cveta i stabla *T. vulgare* ispoljili su jaku aktivnost na sve testirane vrste bakterija. MIK kretale su se u intervalu od 0,02-0,75 mg/mL, dok su MBK bile u opsegu do 0,09-0,94 mg/mL. MIK referentnih antibiotika Streptomicina i Ampicilina kretale su se u intervalu od 0,04-0,74 mg/mL dok su MBK bile u rasponu od 0,09-1,24 mg/mL.

*S. aureus* je bila senzitivna na sve metanolne ekstrakte ali su ekstrakti lista i cveta imali najniže MIK (0,5 mg/mL) i MBK (0,9 mg/mL). Metanolni ekstrakti lista i cveta ispoljili su jaku antibakterijsku aktivnost prema ovoj bakteriji koja je bila jača od aktivnosti Ampicilina i jednako jaka kao aktivnost Streptomicina. Metanolni ekstrakti cveta i lista pokazali su jaku antibakterijsku aktivnost i prema *B. cereus* i *M. Flavus* i delovali bakteristatski i baktericidno na koncentracijama dosta nižim od koncentracija referentnih antibiotika. Metanolni ekstrakt korena je imao najjaču antibakterijsku aktivnost na *P. aeruginosa* sa MIK od 0,09 mg/mL i MBK od 0,18 mg/mL što su dosta niže koncentracije od MIK i MBK testiranih antibiotika. Bakteriostatska kao i baktericidna koncentracija metanolnih ekstrakata lista i cveta na patogenu bakteriju *S. typhimurium* nije se statistički značajno razlikovala od MIK i MBK Streptomicina i Amicilina. Svi testirani metanolni ekstrakti su ispoljili jaču ili jednako jaku antibakterijsku aktivnost prema *E. coli* u odnosu naprimenjene antibiotike. Metanolni ekstrakti lista, cveta i korena delovali su inhibitorno i baktericidno na *E. cloacae* na koncentraciji nižoj od koncentracije referentnih antibiotika. Metanolni ekstrakt cveta je ispoljio inhibitornu aktivnost na *L. Monocytogenes* pri koncentraciji od samo 0,02 mg/mL što je efikasnija inhibicija u odnosu na pozitivne kontrole primenjene u eksperimentu. Iako su u odnosu na patogena *L. monocytogenes* svi ekstrakti imali jaku aktivnost najnižu vrednost MBK ispoljio je Streptomicin (0,34 mg/mL). Mikrodilucionom metodom utvrđeno je da su metanolni ekstrakti ispoljili jaču antibakterijsku aktivnost nego etarsko ulje na većinu ispitivanih bakterijskih vrsta.

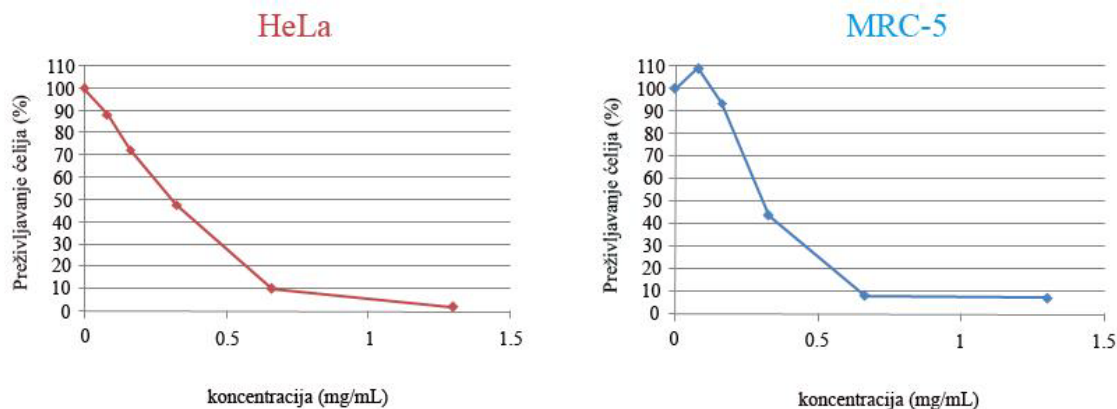
Metanolni ekstrakti korena, lista, cveta i stabljike su pokazali i jaku antifungalnu aktivnost. MIK metanolnih ekstrakata kretale su se u intervalu od 0,002-1,00 mg/mL dok su MFK bile u opsegu od 0,006-2,0 mg/mL. Vrednosti za MIK referentnih antimikotika bile su u rasponu od 0,1-2,5 mg/mL dok su MBK imale vrednosti između 0,2-3,5 mg/mL.

Metanolni ekstrakti korena, lista i stabljike pokazali su jaču inhibitornu aktivnost (0,13 mg/mL) na *A. fumigatus* od testiranih antimikotika (0,15 i 0,20 mg/mL) dok su ekstrakti lista i korena ispoljili i jaču fungicidnu aktivnost u odnosu na referentne antimikotike. Metanolni ekstrakt stabljike je ispoljio posebno jaku aktivnost na patogenu mikromicetu *A. versicolor*, znatno bolju u odnosu na Bifonazol i Ketokonazol. Svi metanolni ekstrakti su ispoljili slabiju antifungalnu aktivnost na *A. ochraceus* u odnosu na Bifonazol ali jaču u odnosu na Ketokonazol. Metanolni ekstrakt korena je najbolje delovao na *A. niger* (MIK 0,002 mg/mL; MFK 0,003 mg/mL) na koncentracijama znatno nižim od referentnih antimikotika (MIK 0,15-0,20 mg/mL; MFK 0,20-0,50 mg/mL). Najjače antifungalno dejstvo na *T. viride* u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte i antimikotike imao je metanolni ekstrakt stabljike (MIK 0,03 mg/mL; MFK 0,23 mg/mL). Iako je etarsko ulje ispoljilo jaču aktivnost na vrste roda *Penicillium*, metanolni ekstrakti su takođe pokazali jaku antifungalnu aktivnost.

#### 4.7. Ispitivanje *in vitro* citotoksične aktivnosti

Citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata i etarskog ulja *T. vulgare* izražena je kao koncentracija koja smanjuje preživljavanje ispitivane ćelijske kulture za 50%, IC<sub>50</sub> vrednost. Ove vrednosti su očitane sa dijagrama preživljavanja ćelija. Citotoksična aktivnost ispitivana je SRB testom u *in vitro* uslovima na ćelijskim linijama humanog adenokarcinoma cerviksa (HeLa) i na zdravim humanim ćelijskim linijama fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5).

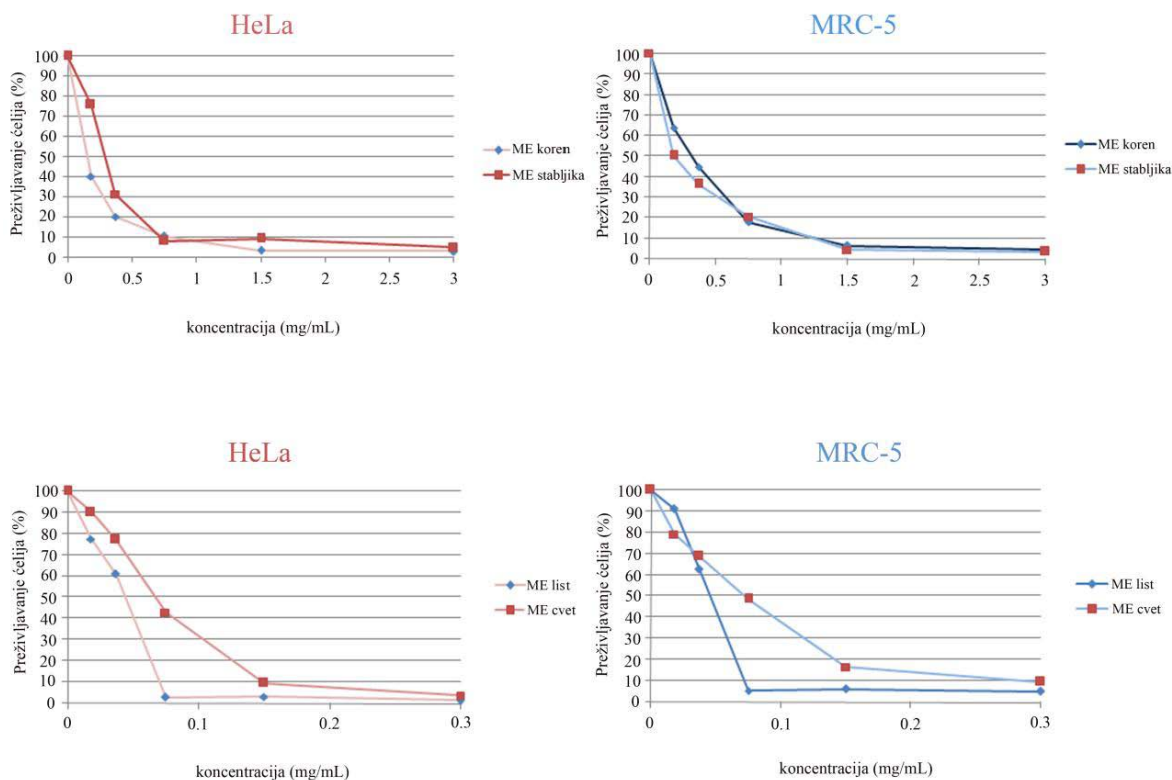
Dijagrami preživljavanja pokazali su da su etarsko ulje i svi ispitivani metanolni ekstrakti ispoljili selektivnu dozno-zavisnu citotoksičnu aktivnost prema ćelijama karcinoma i zdravim ćelijskim linijama (Slika 4.16. i 4.17.). IC<sub>50</sub> vrednosti za svaki od analiziranih ekstrakata prikazane na slici 4.18. (E i J).



**Slika 4.16.** Zavisnost preživljavanja HeLa i MRC-5 ćelija od koncentracije etarskog ulja, određena SRB testom nakon 72 h kontinualnog delovanja ulja.

Etarsko ulje je ispoljilo slabiju citotoksičnu aktivnost u odnosu na sve metanolne ekstrakte i bilo je potrebno dodati najveću koncentraciju da bi se preživljavanje ćelija svelo na 50%. Ipak, ako se posmatra osetljivost različitih ćelijskih linija, citotoksična aktivnost etarskog ulja je bila jača prema HeLa ( $IC_{50} = 290 \mu\text{g/mL}$ ) nego prema MRC-5 ćelijama ( $IC_{50} = 340 \mu\text{g/mL}$ ).

Metanolni ekstrakti stabljike i korena delovali su slabije na proliferaciju ciljnih ćelija u odnosu na metanolne ekstrakte lista i cveta. Interesantno je da je metanolni ekstrakt stabljike ispoljio jaču antiproliferativnu aktivnost na MRC-5 ćelije ( $IC_{50} = 190 \mu\text{g/mL}$ ) nego na HeLa ćelije ( $IC_{50} = 260 \mu\text{g/mL}$ ). Metanolni ekstrakt korena ispoljio je selektivnu antiproliferativnu aktivnost koja je bila jača prema malignim HeLa ćelijama ( $IC_{50} = 170 \mu\text{g/mL}$ ) u odnosu na MRC-5 ćelije ( $IC_{50} = 300 \mu\text{g/mL}$ ). Metanolni ekstrakti lista i cveta ispoljili su značajnu antiproliferativnu aktivnost koja se kretala u mikrogramskim koncentracijama (do  $100 \mu\text{g}$ ). MRC-5 ćelijske linije su se pokazale kao osetljivije na dejstvo metanolnog ekstrakta cveta ( $IC_{50} = 65,72 \mu\text{g/mL}$ ) nego HeLaćelijske linije ( $IC_{50} = 70,59 \mu\text{g/mL}$ ). Metanolni ekstrakt lista je ispoljio najjaču antiproliferativnu aktivnost (u odnosu na etarsko ulje i ostale ispitivane metanolne ekstrakte).

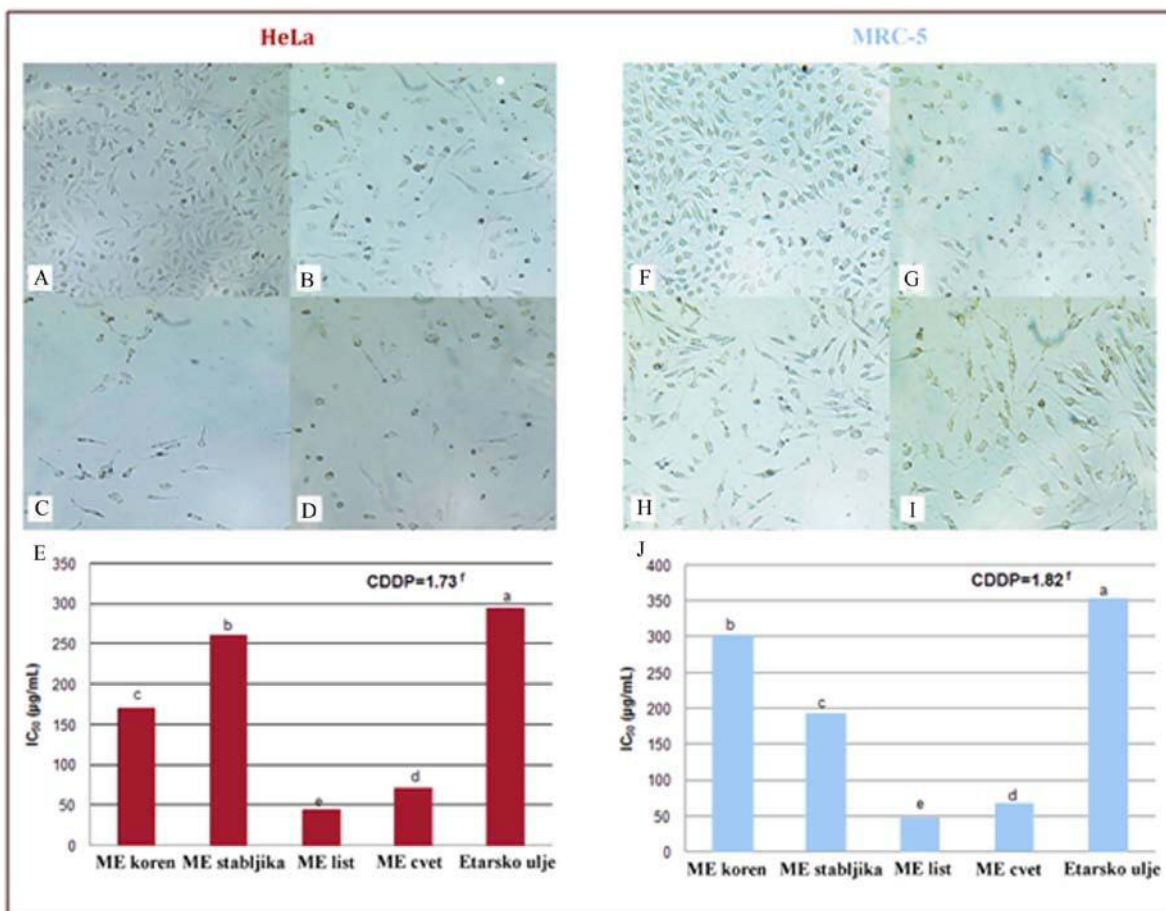


**Slika 4.17.** Zavisnost preživljavanja HeLa i MRC-5 ćelija od koncentracije testiranih metanolnih ekstrakata, određena SRB testom nakon 72h kontinualnog delovanja.

Ovaj ekstrakt je pokazao i blagu selektivnost indukujući inhibiciju proliferacije 50% HeLa ćelija ( $IC_{50} = 43,39 \mu\text{g/mL}$ ) na nižoj koncentraciji u odnosu na istu vrednost za MRC -5 ćelije ( $IC_{50} = 45,27 \mu\text{g/mL}$ ).

Etarsko ulje *T. vulgare* kao i svi ispitivani ekstrakti ispoljili su znatno slabiju antiproliferativnu aktivnost na ciljne ćelije u odnosu na CDDP ( $IC_{50} = 1,73$  i  $1,82 \mu\text{g/mL}$ ) koji je korišćen kao pozitivna kontrola (Slika 4.17).

Metanolni ekstrakti lista i cveta koji su SRB testom pokazali antiproliferativnu aktivnost u mikrogramskom opsegu koncentracija korišćeni su za morfološku analizu ćelijske smrti primenom svetlosne mikroskopije.



**Slika 4.18.** Efekti metanolnih ekstrakata (ME) lista i cveta *T. vulgare* koncentracije 50 µg/mL na morfološke promene humanih tumorskih (HeLa) i kontrolnih zdravih ćelija (MRC-5) nakon 72 h, posmatrani na invertnom mikroskopu. (A) Morfologija netretiranih HeLa ćelija; (B) HeLa ćelije tretirane sa 1,7 µg CDDP; (C) HeLa ćelije tretirane sa ME lista; (D) HeLa ćelije tretirane sa ME cveta; (E) IC<sub>50</sub> vrednosti za HeLa ćelije; (F) Morfologija netretiranih MRC-5 ćelija; (G) MRC-5 ćelije tretirane sa 1,7 µg CDDP; (H) MRC-5 ćelije tretirane sa ME lista; (I) MRC-5 ćelije tretirane sa ME cveta; (J) IC<sub>50</sub> vrednosti za MRC-5 ćelije.

Kao što je prikazano naslici 4.18 A kontrolne netretirane HeLa ćelije su bile adherirane za hranljivu podlogu, imale su pravilni poligonalni oblik sa uobičajenim membranskim ispupčenjima (lamelipodije) i samo ponekom ćelijom okruglog oblika. Nakon tretmana metanolnim ekstraktima lista i cveta, kod većine HeLa ćelija došlo je do gubitka adhezije što je ukazivalo na ćelijsku smrt. Kod ostatka ćelija adheriranih za podlogu primećeno je skupljanje membrane i zaokrugljivanje ćelija (Slika 4.18. C i D). Ove morfološke promene

bile su slične onima koje su se javile nakon tretmana HeLa ćelija cisplatinom (Slika 4.18. B) u koncentraciji koja odgovara IC<sub>50</sub> vrednosti ovog citostatika (1,7 µg/mL) a koji su tipične morfološke karakteristike apoptoze.

Interesantno je da metanolni ekstrakti lista i cveta primenjeni u istim uslovima nisu doveli do značajnijeg gubitka adhezije MRC-5 ćelija (Slika 4.18. H i I). Pored toga, ove ćelije su počele da se izdužuju, menjaju oblik i očigledno slabije proliferišu. Morfološke promene na MRC-5 ćelijama kao što su skupljanje membrane, zaokrugljivanje ćelija i gubitak adhezije bile su vidljive nakon tretmana cisplatinom (Slika 4.18. G).

#### **4.8. Ispitivanje efekta etarskog ulja na gusenice gubara (*Lymantria dispar* L.)**

Efekat etarskog ulja na larve gubara praćen je kroz analizu rezidualne kontaktne toksičnosti na mortalitet i razviće larvi (Tabele 4.7. i 4.8.), ali i indirektnog delovanja ulja unetog kroz hranuna performanse rastejnairazvićaovihlarvi (Tabela 4.11.).

##### **4.8.1. Ispitivanje rezidualne kontaktne toksičnosti etarskog ulja *T. vulgare* na gusenice gubara**

Kada su larve gubara drugog stupnja razvića bile izložene delovanju etanolnim rastvorima etarskog ulja *T. vulgare* u koncentracijama 0,1; 0,5 i 1,0 % tokom prvih 48 h nije došlo do toksičnog efekta i mortaliteta gusenica. Nakon 72 h od početka ogleda zabeležen je mortalitet od 2% samo kod gusenica koje su bile izložene najvećoj primenjenoj koncentraciji etarskog ulja (1,0%). U sledećih 24 h i dalje nije bilo uginulih kontrolnih larvi ali ni onih izloženih ulju koncentracije 0,1 i 0,5 %, dok je 1,0% ulje izazvalo povećan mortalitet od 4% (Tabela 4.7.). Tek nakon 120 h prisustvo etarskog ulja niže koncentracije (0,5 %) izazvalo je mortalitet 2% gusenica što se nije statistički značajno razlikovalo od procenta uginulih na 1% ulju ( $F=1,90$  i  $P=0,21$ ). Etarsko ulje *T. vulgare* u koncentraciji od 0,1% nije delovalo toksično na gusenice gubara drugog stupnja razvića.

**Tabela 4.7.** Mortalitet gusenica gubara drugog stupnja izazvan rezidualnom kontaktnom toksičnošću etarskog ulja *T. vulgare*.

	Konc. ulja (%)	Mortalitet (%)		
		72 h	96 h	120 h
	0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	0,5	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 2 <sup>a</sup>
	1,0	2 ± 2,0	4 ± 2,45	8 ± 3,74 <sup>a</sup>
<b>Kontrola</b>	0,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Veličina uzorka je 50 larvi za svaku testiranu koncentraciju etarskog ulja. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema Dankanovom testu ( $P \leq 0.05$ ) u okviru iste vremenske tačke (kolone).

Direktno delovanje etarskog ulja *T. vulgare* prikazano je i kroz analizu presvlačenja gusenica gubara iz drugog u treći larveni stupanj (Tabeli 4.8.). U prvih 72 h od početka ogleda nije zabeleženo presvlačenje gusenica kako kod kontrolne grupe, tako i kod gusenica izloženih delovanju ulja. Do presvlačenja gusenica u svim eksperimentalnim grupama došlo je nakon 96 h od početka ogleda. U ovoj vremenskoj tački sve primenjene koncentracije etarskog ulja izazvale su smanjenje procenta presvučenih gusenica (10,44 kod 0,1% ulja i 12% kod 0,5 i 1,0%) u odnosu na kontrolu (24%) ali to smanjenje nije bilo statistički značajno ( $F=1,63$  i  $P=0,22$ ).

**Tabela 4.8.** Uticaj rezidualne kontaktne toksičnosti etarskog ulja *T. vulgare* na presvlačenje gusenica gubara iz drugog u treći larveni stupanj.

	Konc. ulja (%)	Presvučene gusenice (%)	
		96 h	120 h
	0,1	12,0 ± 3,74 <sup>a</sup>	64,0 ± 9,27 <sup>ab</sup>
	0,5	12,0 ± 5,83 <sup>a</sup>	64,88 ± 9,80 <sup>ab</sup>
	1,0	10,44 ± 4,74 <sup>a</sup>	54,11 ± 14,27 <sup>a</sup>
<b>Kontrola</b>	0,0	24,0 ± 2,45 <sup>a</sup>	92,0 ± 3,74 <sup>b</sup>

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Veličina uzorka je 50 larvi za svaku testiranu koncentraciju etarskog ulja. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema Dankanovom testu ( $P \leq 0.05$ ) u okviru iste vremenske tačke (kolone).



Nakon 120 h od početka oglada čak 92% kontrolnih gusenica prešlo je iz drugog u treći stadijum razvića. Etarsko ulje je odložilo ovaj proces i dovelo do smanjenja procenta presvučenih gusenica, pri čemu je na koncentraciji od 1,0% ovo smanjenje bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu sa svega 54 % presvučenih jedinki ( $F=3,32$  i  $P=0,05$ ).

#### **4.8.2. Ispitivanje digestivne toksičnosti etarskog ulja na gusenice gubara drugog stupnja**

Indirektna toksičnost etarskog ulja *T. vugare* na larve gubara analizirana je kroz praćenje mortaliteta ipresvlačenja gusenica iz drugog u treći stupanj izazvan nakon digestije hrane u kojoj se nalazilo rastvoreno ovo etarsko ulje (Tabele 4.9. i 4.10.). Rezultati su pokazali da tokom 120 h nije došlo do uginuća kontrolnih gusenica gubara drugog stupnja kojima u hranu nije dodavano etarsko ulje (Tabela 4.9.). Takođe, ni etarsko ulje primenjeno u koncentraciji od 0,1% nije uzrokovalo smrtnost gusenica tokom čitavog perioda.

Prisustvo etarskog ulja u hrani u preostale dve koncentracije (0,5 i 1,0%) dovelo je do povećanog uginuća larvi već nakon 24 h od ingestije, ali ulje u tim koncentracijama nisu statistički značajno uticale na procenat preživljavanja ( $F=3,11$  i  $P=0,1159$ ). U svim ostalim vremenskim tačkama statistički značajno veći mortalitet izazvan digestivnom toksičnošću ispoljilo je etarsko ulje u koncentraciji od 1,0 % (48 h:  $F=11,01$  i  $P=0,0106$ ; 72 h:  $F=15,39$  i  $P=0,0044$ ; 96 h:  $F=16,80$  i  $P=0,0035$ ; 120 h:  $F=7,48$  i  $P=0,0257$ ). Nakon 48 h uginulo je čak 6,5 puta više larvi koje su hranom unele 1,0% etarsko ulje nego onih koje su se hranile hranom sa 0,5% uljem. Na kraju eksperimenta, posle 120 h prisustvo 1,0% ulja u hrani je izazvalo uginuće čak 72% larvi.

**Tabela 4.9.** Mortalitet gusenica gubara drugog stupnja izazvan digestivnom toksičnošću etarskog ulja *T. vulgare*.

	Konc. ulja(%)	Mortalitet (%)				
		24h	48h	72h	96h	120h
	0,1	0 ± 0	0±0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	0,5	4,0 ± 4,0 <sup>a</sup>	4,0±4,0 <sup>b</sup>	8,0±5,83 <sup>b</sup>	18,0±9,17 <sup>b</sup>	30,0±12,6 <sup>b</sup>
	1,0	12,0±3,74 <sup>a</sup>	26,0±7,48 <sup>a</sup>	44,0±6,78 <sup>a</sup>	68,0±2,0 <sup>a</sup>	72,0±3,74 <sup>a</sup>
<b>Kontrola</b>	0,0	0±0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Veličina uzorka je 50 larvi za svaku testiranu koncentraciju etarskog ulja. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema Dankanovom testu ( $P \leq 0.05$ ) u okviru iste vremenske tačke (kolone).

U prvih 72 h od početka ogleada nije zabeleženo presvlačenje gusenica ni u jednoj eksperimentalnoj grupi. Početak presvlačenja uočen je nakon 96 h od početka ogleada u kontrolnoj grupi i grupi gusenica hranjenih etarskim uljem u koncentraciji od 0,1% i među ovim grupama nije bilo statistički značajne razlike u broju presvučenih larvi ( $F=2,31$  i  $P=0,1667$ ) (Tabela 4.10.). Etarsko ulje u koncentraciji od 0,5% je dovelo do odlaganja presvlačenja do 120 h od početka ogleada i nakon ovog vremena samo 4% gusenica se presvuklo. Na koncentraciji od 0,1% skoro 70% gusenica je presvučeno, dok je u kontrolnoj grupi ovaj broj dostigao čak 90% ( $F=66,00$  i  $P < 0,0001$ ).

**Tabela 4.10.** Uticaj digestivne toksičnosti etarskog ulja *T. vulgare* na presvlačenje gusenica gubara iz drugog u treći larveni stupanj.

	Konc. ulja (%)	Presvučene gusenice (%)	
		96 h	120 h
	0,1	16,0 ± 6,78 <sup>a</sup>	68,0 ± 4,90 <sup>b</sup>
	0,5	0 ± 0	4,0 ± 2,45 <sup>a</sup>
	1,0	0 ± 0	0 ± 0
<b>Kontrola</b>	0,0	26,0 ± 2,45 <sup>a</sup>	90,0 ± 3,16 <sup>c</sup>

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška (SE). Veličina uzorka je 50 larvi za svaku testiranu koncentraciju etarskog ulja. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike prema Dankanovom testu ( $P \leq 0,05$ ) u okviru iste vremenske tačke (kolone).

Analizom rezultata uticaja digestivne toksičnosti etarskog ulja na presvlačenje gusenica gubara iz drugog u treći stupanj razvića uočava se da je koncentracija etarskog ulja od 1,0% u potpunosti zaustavila presvlačenje gusenica gubara.

#### 4.8.3. Ispitivanje uticaja etarskog ulja na indekse rasta i ishrane gusenica gubara četvrtog stupnja

Osim što je uticalo na preživljavanje i presvlačenje, odnosno prelazak larvi kroz stadijume razvića, etarsko ulje *T. vulgare* prisutno u hrani imalo je značajan uticaj i na druge performanse rasta i razvića larvi gubara (Tabela 4.11.).

Kada su larve četvrtog stadijuma razvića nakon 24 h izgladnjivanja nahranjene hranom sa etarskim uljem (0,1; 0,25 i 0,5%) uočene su statistički značajane razlike u masi u odnosu na kontrolne larve kojima nije dodavano etarsko ulje u hranu. Porast mase posmatrannarelativnomnivou, kao porast mase po danu (RGR) pokazao je statistički značajan ( $F=9,73$  i  $P=0,0001$ ) negativan uticaj etarskog ulja koji se povećavao sa porastom koncentracije ulja. Tako su najmanji porast mase od 0,06 mg po danu imale larve koje su se hranile podlogama sa najvišom primenjenom koncentracijom od 1,0% etarskogulja, dok su najveći porast mase imale kontrolne larve sa 0,3 mg po danu.

**Tabela 4.11.** Uticaj etarskog ulja *T.vulgare* na relativnu brzinu rasta (RGR), relativnu brzinu konzumacije hrane (RCR), efikasnost asimilacije hrane (AD), efikasnost konverzije unete hrane (ECI) i efikasnost konverzije svarene hrane (ECD) gusenica.

	Konc. ulja (%)	RGR [mg/(mg*dan)]	RCR [mg/(mg*dan)]	AD (%)	ECI (%)	ECD (%)
	0,1	0,19 ± 0,021 <sup>b</sup>	0,87 ± 0,054 <sup>b</sup>	57,11 ± 2,926 <sup>ab</sup>	21,54 ± 3,883 <sup>ab</sup>	40,48 ± 7,827 <sup>a</sup>
	0,5	0,08 ± 0,030 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,081 <sup>ab</sup>	56,73 ± 3,474 <sup>ab</sup>	10,19 ± 5,462 <sup>a</sup>	23,51 ± 11,671 <sup>a</sup>
	1,0	0,06 ± 0,036 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,44 <sup>a</sup>	48,09 ± 5,913 <sup>a</sup>	10,62 ± 6,716 <sup>a</sup>	16,55 ± 18,842 <sup>a</sup>
Kontrola	0,0	0,30 ± 0,017 <sup>c</sup>	1,23 ± 0,129 <sup>c</sup>	63,82 ± 1,658 <sup>b</sup>	26,05 ± 2,431 <sup>b</sup>	41,62 ± 4,684 <sup>a</sup>

Razlike između vrednosti RGR, RCR, AD, ECI i ECD obeležene istim slovom u koloni nisu statistički značajne (Dankanov post hoc test,  $P < 0,05$ ).

Smanjenje mase larvi nakon konzumiranja etarskog ulja kod larvi gubara četvrtog stadijuma razvića bilo je praćeno i statistički značajnim ( $F=19,13$  i  $P<0,0001$ ) smanjenjem relativne brzine konzumacije hrane (RCR), izraženim preko mase pojedene hrane po danu (Tabela 4.11.). Dok su kontrolne larve dnevno jele 1,23 mg hrane po mg sopstvene mase, prisustvo etarskog ulja je smanjivalo apetit i unos hrane je opadao od 0,87mg po mg sopstvene mase na 0,1% ulju do 0,61 mg po mg sopstvene mase na 1,0% ulju.

Smanjen unos hrane koja je sadržavala etarsko ulje uticao je i na smanjenje efikasnosti asimilacije hrane (AD) kod larvi gubara četvrtog stadijuma razvića, ali je ova promena bila statistički značajana u odnosu na kontrolu samo kod najviše primenjene koncentracije ulja ( $F=0,53$  i  $P=0,6682$ ). Iako je etarsko ulje dodavano u hranu zagusenice u manjoj koncentraciji (0,5 i 0,1%) takođe je dovelo do značajnog smanjenja prirasta mase larvi (RGR) i količine konzumirane hrane (RCR) količina asimilovane hrane se nije statistički značajno smanjila u odnosu na kontrolu. Čak 56,73 i 57,11% unete hrane koja je sadržavala 0,1 i 0,5% etarskog ulja je asimilovano, slično kontrolnoj grupi kod koje je asimilovano 63,8 %.

Najveća efikasnost konverzije unete hrane u biomasu larvi (ECI) zabeležena je kod gusenica u kontrolnoj grupi kod kojih je čak 26 % unete hrane konvertovano u masu tela. Etarsko ulje *T. vulgare* uzrokovalo je smanjenje ECI vrednosti te je značajan pad u procentu konverzije unete hrane (10,19 i 10,62 %) zabeležen kod gusenica koje su konzumirale hranu sa dodatkom etarskog ulja u koncentracijama od 0,5 i 1,0 %.

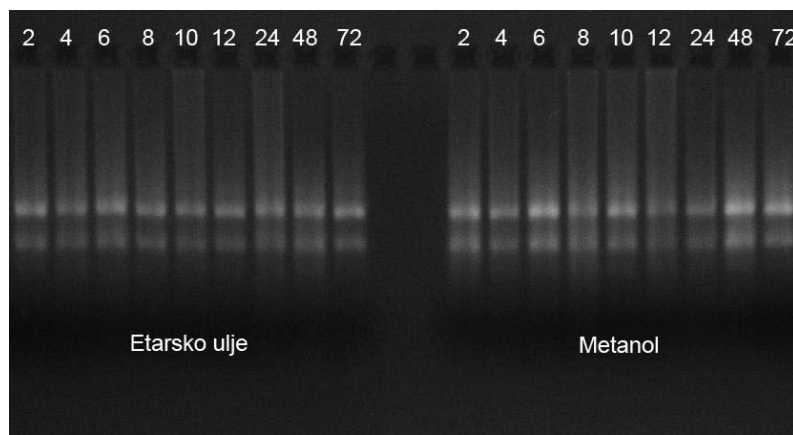
Slično, etarsko ulje je uticalo i na efikasnost konverzije svarene hrane (ECD). I kod ovog parametra vidi se zavisnost od koncentracije primenjenog etarskog ulja, pa su tako najniži stepen konverzije svarene hrane imale larve sa hrane koja je u sebi sadržavala najveći procenat etarskog ulja (16,55 %), dok je kod kontrolnih larvi čak 41,62% svarene hrane bilo konvertovano u biomasu tela. Međutim, taj uticaj nije zabeležen kao statistički značajan u odnosu na kontrolnu grupu ( $F=0,9$  i  $P=0,4509$ ).

#### 4.9. Ispitivanje potencijala etarskog ulja *T. vulgare* za indukciju odbrambenih mehanizama krompira (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro*

Praćenjem nivoa ekspresije *PR-2*, *PR-5*, *PIN2* i *PAL1* gena kod krompira (*Solanum tuberosum* L.) gajenog *in vitro* ispitivan je potencijal etarskog ulja *T. vulgare* da indukuje odbrambene mehanizme na herbivore i patogene. Detektovana su i isparljiva jedinjenja etarskog ulja u atmosferi posude u kojoj je gajen krompir. Nivo stresa koji je indukovano u biljkama krompira nakon tretmana etarskim uljem praćen je analizom katalaza, enzima antioksidativne zaštite.

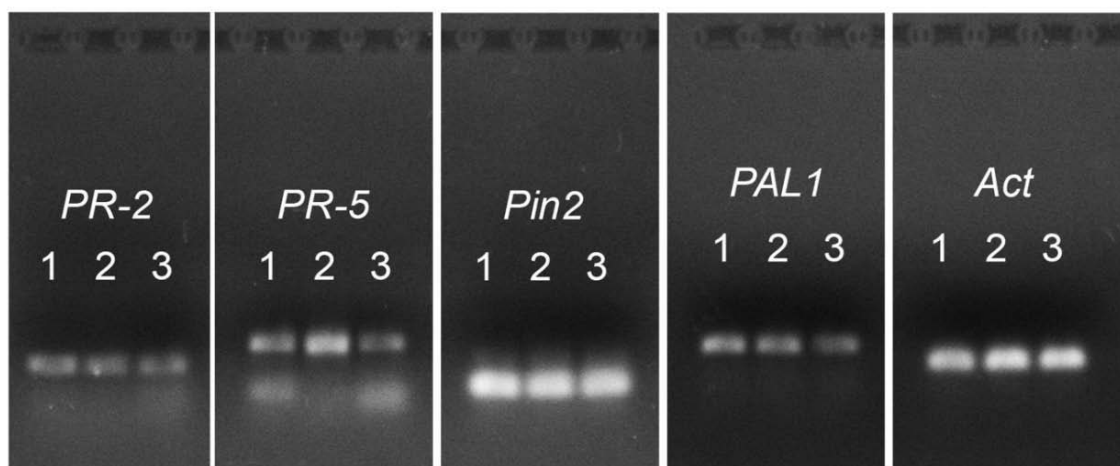
##### 4.9.1. Analiza ekspresije gena koji učestvuju u odbrambenom odgovoru krompira

Iz izdanaka krompira izloženog delovanju etarskog ulja *T. Vulgare* tokom 72 h izolovane su ukupne RNK. Kvalitet izolovanih RNK je proveren na agaroznom gelu. Utvrđeno je da su izolovane RNK bile zadovoljavajućeg kvaliteta i koncentracije (Slika 4.21.).



**Slika 4.21.** RNK izolovane iz izdanaka krompira tretiranog etarskim uljem *T. vulgare* ili metanolom tokom 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 i 72 h. Na 1,2% agarozni gel nanet je po 1  $\mu$ g ukupnih RNK za svaki uzorak.

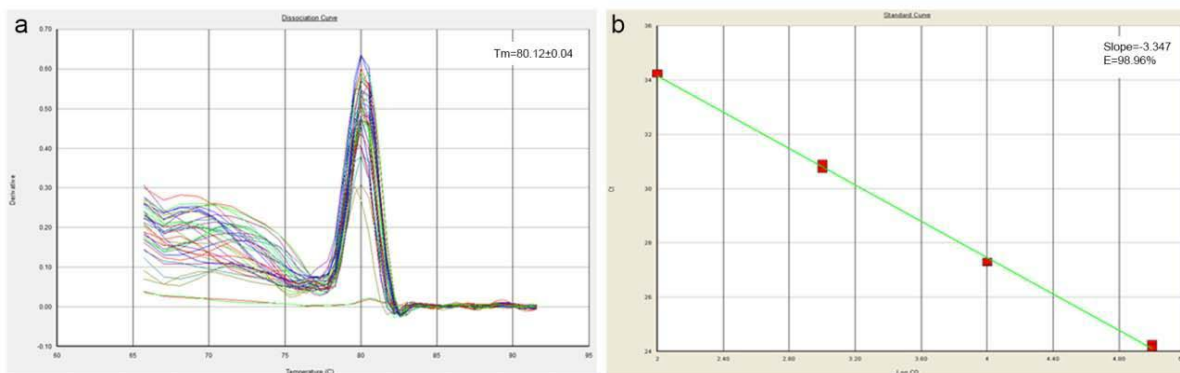
Izolovana RNK je reverzno transkribovana i potom je dobijena cDNK amplifikovana prajmerima specifičnim za pet analiziranih gena radi provere specifičnosti amplifikacije (Slika 4.22.).



**Slika 4.22.** PCR produkti analiziranih gena krompira (*PR-2*, *PR-5*, *Pin2*, *PAL1* i aktina) amplifikovanih na temperaturama od 56°C (1), 58°C (2) i 60°C (3).

Nakon verifikacije amplifikacije PCR analizom, cDNK je korišćenjem ovih prajmera umnožavana u reakcijama kvantitativnog PCR (qPCR) na temperaturi od 60°C.

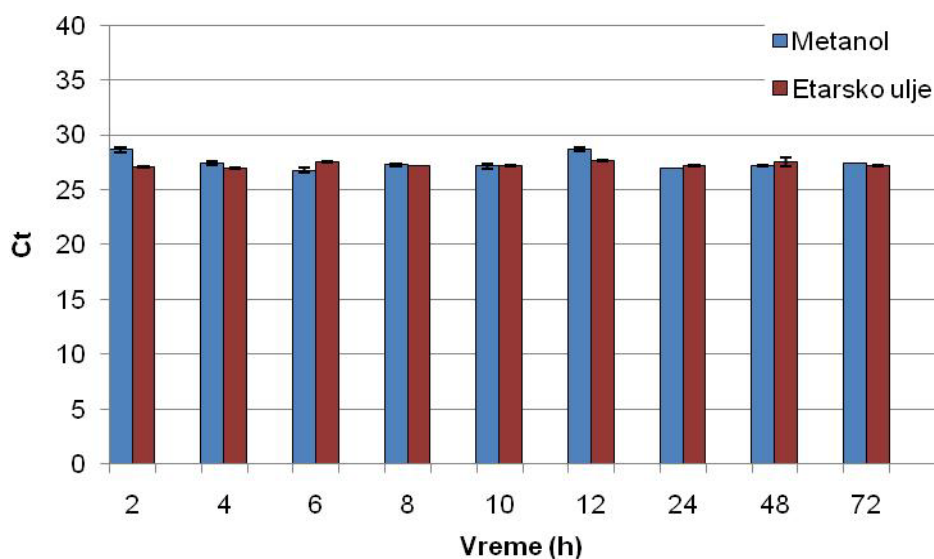
Specifičnost amplifikacije svih 5 gena je još jednom potvrđena analizom temperatura topljenja ( $T_m$ ) produkta nakon qPCR amplifikacije. Rezultati su pokazali da nije bilo značajnih odstupanja od srednje vrednosti za  $T_m$  kod svih gena, a primer dobre krive topljenja dat je na slici 4.23. za aktinski gen.



**Slika 4.23.** Primer specifične i visoko efikasne amplifikacije aktinskog gena krompira prikazan kroz dobro oblikovanu krivu topljenja (a) i standardnu krivu (b).

Amplifikacijom standarda koji su predstavljali seriju razblaženja jednog od uzoraka dobijene su standardne krive za svaki od analiziranih gena. Nagibi krive (Slope) i efikasnosti koje iz njih proizlaze prikazane su u tabeli 4.12. Na osnovu dobijenih nagiba kriva (Slope: -3,18 za PR-2; -3, -3.612 za PR-5; -3.427 za Pin2; -3,02 za PAL1; -3,35 za Act) preračunate su efikasnosti qPCR reakcija za svaki od 5 analiziranih gena i pokazano da su sve bile u opsegu preporučenih vrednosti od 80% do 120% (Efikasnost: 106, 24% za PR-2; 89,17% za PR-5; 95,79% za Pin2; 114,35% za PAL1; 98,96% za Act).

Pre analize ekspresije pojedinačnih gena proverena je ujednačenost količine ukupne cDNK svih uzoraka amplifikacijom referentnog gena za aktin. Prosečan broj ciklusa posle kojih se dostizao prag detekcije ( $C_t$ ) referentnog gena za aktin bio je ujednačen, što je potvrdilo i odsustvo statistički značajne razlike između analiziranih uzoraka (Slika 4.24.). Prosečna  $C_t$  vrednost referentnog gena za aktin, u svim analiziranim uzorcima je iznosila  $27,39 \pm 0,09$ .

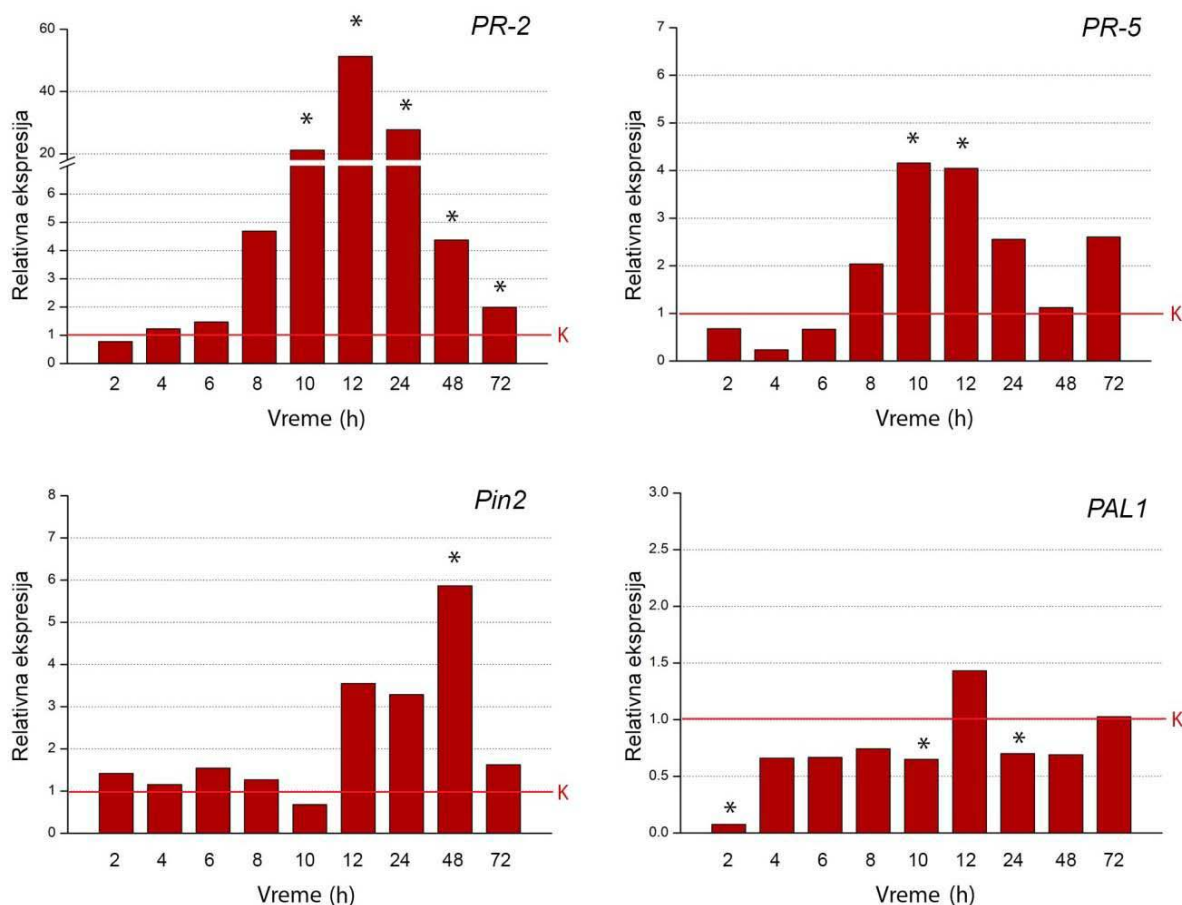


**Slika 4.24.** Broj ciklusa posle kojih je dosegnut prag detekcije amplifikacije (Ct vrednost) sekvence referentnog gena *Act* prilikom qPCR amplifikacije cDNK biljaka krompira izloženih dejstvu metanola i etarskog ulja *T. vulgare* tokom 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 i 72 h.

Nakon dobijenih Ct vrednosti tokom qPCR amplifikacije, nivo ekspresije *PR-2*, *PR-5*, *Pin2* i *PAL1* gena računat je korišćenjem  $\Delta\Delta Ct$  metode. Nivo ekspresije u uzorcima tretiranim etarskim uljem za svaku vremensku tačku dobijen je nakon normalizacije prema uzorcima koji su bili izloženi delovanju metanola i kojima je dodeljena vrednost 1.

Kod svih analiziranih gena delovanje etarskog ulja dovelo je do statistički značajnih razlika u nivou ekspresije u odnosu na metanolne kontrole u pojedinim tačkama (Slika 4.25.). Najveće promene u nivou ekspresije zabeležene su za *PR-2* gen kod koga je nakon 12 h ekspresija bila čak 50 puta veća nego u uzorcima koji nisu bili izloženi etarskom ulju. Na početku izlaganja etarskom ulju ekspresija ovog gena je bila na nivou ekspresije u kontrolama, ali nakon 10 h ekspresija je povećana više od 20 puta. Ovaj trend se nastavio i tokom naredna 4 sata, sa već pomenutim maksimumom zabeleženim u 12 h od početka eksperimenta. Nakon ovog izuzetnog porasta, nivo ekspresije *PR-2* gena i dalje ostaje značajno viši od kontrole (28 puta nakon 24 h i oko 4,3 puta nakon 48 h).





**Slika 4.25.** Relativna ekspresija *PR-2*, *PR-5*, *Pin2* i *PAL1* gena kod krompira gajenog *in vitro* izloženog dejstvu etarskog ulja *T. vulgare* tokom 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 i 72 h prikazana u odnosu na ekspresije datih gena dobijene u kontrolnim uzorcima tretiranim čistim metanolom (K) kojima je dodeljena vrednost 1.

Nakon 72 h od izlaganja delovanju etarskog ulja nivo ekspresije ovog gena i dalje je bio 2 puta viši nego u kontrolnim netretiranim biljkama krompira. .

I kod *PR-5* gena najznačajnije promene zabeležene su nakon 10 i 12 h od početka eksperimenta. Do 10. sata ekspresija je postepeno rasla da bi u ovim tačkama bila oko 4 puta veća nego kod kontrola. Nakon 12 h nivo ekspresije polako opada i vraća se na nivo kontrole.

Nešto drugačiji obrazac ekspresije zabeležen je za *Pin2* gen kod koga je detektovana statistički značajno povećanje u nivou ekspresije uzrokovano prisutvom isparljivih jedinjenja iz etarskog ulja samo nakon 48 h sa skoro 6 puta većom ekspresijom nego kod kontrole. U uzorcima prikupljenim nakon 72 h ekspresija je vraćena na nivo zabeležen kod biljaka koje nisu bile tretirane etarskim uljem.

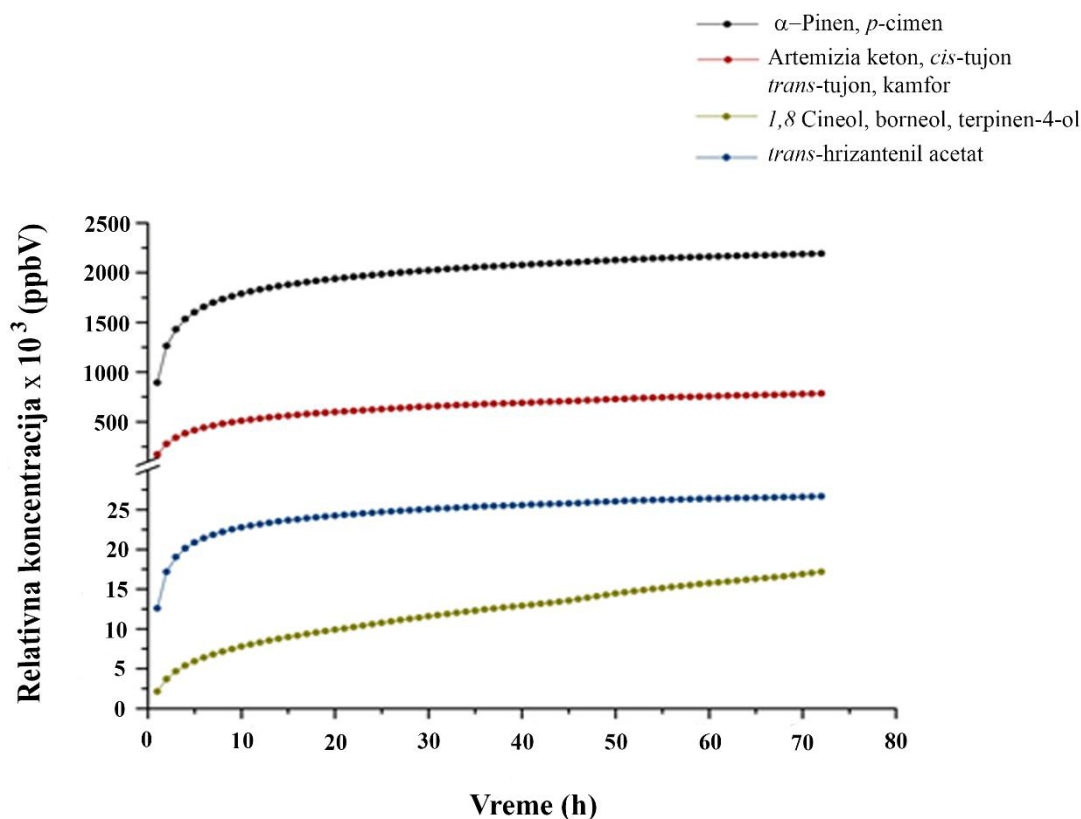
Jedini gen kod koga je etarsko ulje dovelo do snižavanja u nivou ekspresije bio je *PAL1*. Nakon inicijalnog pada u nivou ekspresije već nakon 2 h od početka eksperimenta (sa relativnom ekspresijom od svega 0,077 u odnosu na kontrolu kojoj je data vrednost 1), tokom čitavog perioda *PAL1* je imao nižu ekspresiju u tretiranim nego u kontrolnim uzorcima. Jedino povećanje ali i dalje bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu, zabeleženo je nakon 12 h.

#### **4.9.2. Detekcija isparljivih organskih jedinjenja uređajem PTR-MS**

U pilot eksperimentu testirana je mogućnost primene uređaja PTR-MS u analizi isparljivih organskih jedinjenja u istraživanjima efekta etarskog ulja *T. vulgare* u indukciji odbramenih mehanizama krompira (*Solanum tuberosum* L.) gajenog *in vitro*. Tokom eksperimenta praćena je promena zastupljenosti poznatih grupa organskih jedinjenja, prethodno identifikovanih GC/MS metodom, koja se PTR-MS uređajem detektuju na određenim masama.

Već na samom početku eksperimenta uočene su razlike u zastupljenosti isparljivih jedinjenja koje pripadaju različitim grupama. U atmosferi staklene posude najveća zastupljenost zabeležena je za grupu jedinjenja kojoj pripadaju monoterpenski ugljovodonic  $\alpha$ -pinen i *p*-cimen. Relativna dominacija ove grupe u atmosferi staklene posude održala se i do kraja eksperimenta odnosno do 72 h po izlaganju krompira etarskom ulju *T. vulgare*. Relativni udeo ove grupe jedinjenja u atmosferi staklene posude je na samom početku eksperimenta, u prvih 2 sata, bio oko 65 puta veći od udela *trans*-hrizantenil acetata za koji je GC/MS analizom pokazano da je dominantna komponenta u etarskom ulju *T. vulgare*. Pored ove grupe u atmosferi je sa većim udelom bila zastupljena i

grupa isparljivih jedinjenja kojoj pripadaju artemizia keton, *cis*-tujon, *trans*-tujon i kamfor. Relativna količina ovih jedinjenja u prva 2 h je bila osam puta manja nego jedinjenja koja su dominirala u atmosferi staklene posude. Najmanji udeo u atmosferi imala su isparljivi oksidovani monoterpene 1,8 cineol, borneol i terpinen-4-ol. Isparavanje jedinjenja iz svih praćenih grupa bilo je najintenzivnije u prvih 24 h po izlaganju krompira etarskom ulju. U kasnijim vremenskim tačkama u atmosferi staklene posude održao se sličan odnos među grupama isparljivih jedinjenja do samog kraja eksperimenta. Iako se udeo *trans*-hrizantenil acetata konstantno povećavao što se uočava na Slici 4.20. relativni udeo ovog jedinjenja na kraju eksperimenta je bio preko 80 puta manja od udela  $\alpha$ -pinena i *p*-cimena u atmosferi staklene posude.



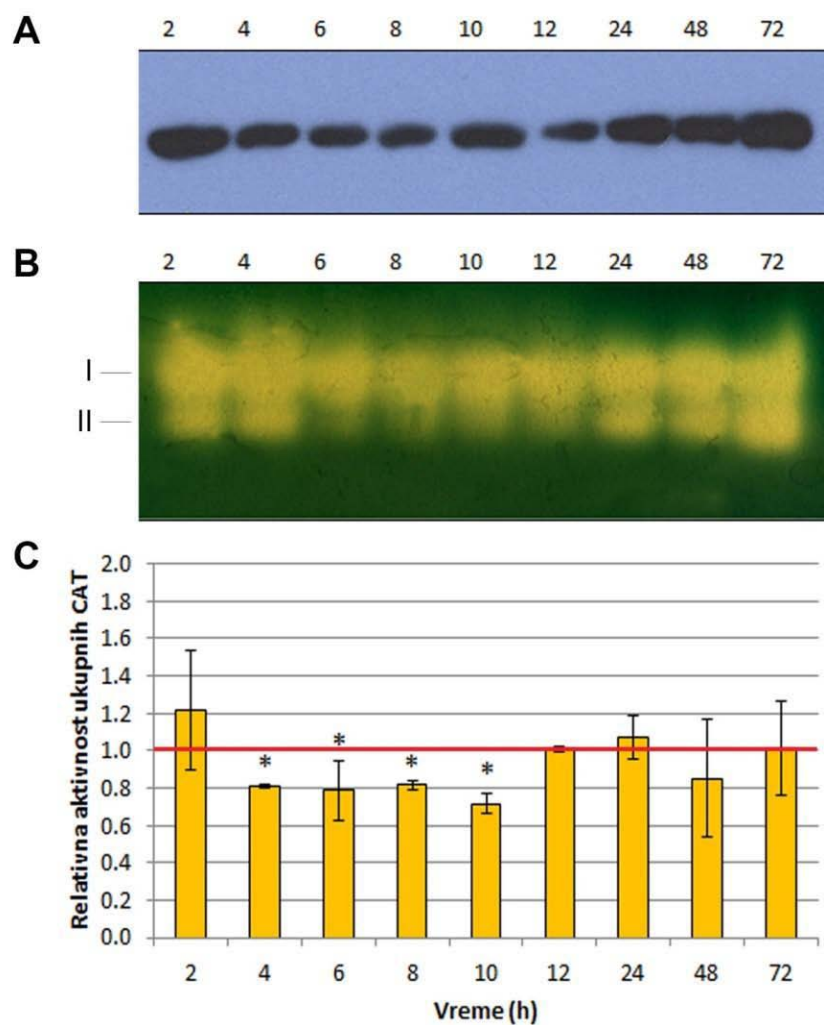
**Slika 4.20.** Relativna koncentracija isparljivih jedinjenja u atmosferi staklene posude u kojoj je gajen krompir *in vitro* izložen etarskom ulju *T. vulgare* tokom 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 i 72 h.

#### 4.9.3. Analiza aktivnosti katalaza kod krompira tokom izlaganja etarskom ulju

U cilju utvrđivanja nivoa stresa koji je indukovao u biljkama krompira nakon izlaganja etarskom ulju *T. vulgare*, praćena je aktivnost antioksidativnih enzima katalaza (CAT).

Prisustvo, broj i aktivnost CAT izoformi utvrđeni su na osnovu imunoblot analize i nativnom elektroforezom proteina dok je njihova relativna ukupna aktivnost određena spektrofotometrijskom kvantifikacijom (Slika 4.19.). Kod svih ispitivanih uzoraka imunoblot analizom sa specifičnim antitelima je detektovano prisustvo jedne CAT izoforme (Slika 4.19. A), dok je nativna elektroforeza potvrdila postojanje dve blisko postavljene aktivne izoforme u svim testiranim vremenskim tačkama (Slika 4.19. B). Obe izoforme su pokazivale slabiju aktivnost u uzorcima prikupljenim 6, 8, 10 i 12 h nakon izlaganja etarskom ulju *T. vulgare*. U ovim uzorcima je naročito traka manje molekulske mase (označena brojem II) bila slabijeg intenziteta nego u preostalim pet uzoraka (2, 4, 24, 48 i 72 h).

Spektrofotometrijsko merenje ukupne aktivnosti CAT pokazalo je sličan obrazac dinamike aktivnosti ovog proteina kod krompira nakon izlaganja etarskom ulju (Slika 4.19. C). I dok je nakon 2 h od izlaganja isparljivim jedinjenjima nivo aktivnosti CAT bio i dalje u nivou aktivnosti kod kontrolnih uzoraka, nakon 4 h zabeležen je statistički značajan pad u aktivnosti od oko 20%. Snižena aktivnost katalaza je ostala na sličnom nivou i tokom narednih 6 sati (tačke 6, 8 i 10 h). Nakon ovog perioda aktivnost katalaza vratila se na nivo detektovan u kontrolnim uzorcima i nije se menjala se sve do kraja eksperimenta, bez statistički značajnog odstupanja u odnosu na odgovarjuće kontrole.



**Slika 4.19.** Prisustvo i aktivnost CAT u biljkama krompira gajenog *in vitro* i izloženog dejstvu etarskog ulja *T. vulgare* tokom 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 i 72 h. (A) Imunoblot analiza je pokazala prisustvo jedne izoforme CAT; (B) Nativna elektroforeza je pokazala aktivnost dve izoforme CAT; (C) Relativna aktivnost ukupnih CAT u odnosu na aktivnosti dobijene u kontrolnim uzorcima tretiranim čistim metanolom kojima je dodeljena vrednost 1.

## 5. DISKUSIJA

Sekundarni metaboliti biljaka su tokom nekoliko poslednjih decenija "prešli dugačak put" od bezvrednih jedinjenja koja predstavljaju opterećenje za energetske status biljke do bioaktivnih jedinjenja koja se danas nalaze u fokusu interesovanja farmaceutske i prehrambene industrije ali i poljoprivrede. I dok je primarni metabolizam ključan za rast i razviće biljke, uniforman i konzervativan, sekundarni metabolizam se smatra ključnim za opstanak biljke na datom staništu, jedinstven je za individuu, raznovrstan i adaptivan. Plastičnost sekundarnih metabolita ogleda se u konstantnom menjanju i prilagođavanju zahtevima sredine. Biljka sekundarnim metabolitima odgovara na sve interakcije sa biotičkom i abiotičkom okolinom. Zbog toga je i ekspresija gena koji kodiraju sintezu ovih jedinjenja precizno i delikatno regulisana kako bi odgovorili na selektivni pritisak promenljive sredine (Hartmann, 2007). S jedne strane sekundarni metaboliti služe kao atraktanti oprašivača i vrsta koje učestvuju u disperziji semena ali istovremeno ovim jedinjenjima se biljka i brani od herbivora i patogena, a služe i kao atraktanti prirodnih neprijatelja herbivora.

Od izolacije morfina 1806. godine do danas, dokazan je i opisan veliki broj bioloških aktivnosti alkaloida, flavonoida, etarskih ulja, tanina i drugih sekundarnih metabolita. Danas se ova jedinjenja koriste u farmaceutskoj industriji kao sirove droge ili ekstrakti dok se neki metaboliti koriste kao izolovana jedinjenja poput morfina (analgetik), efedrina (stimulant centralnog nervnog sistema), papaverina (fosfodiesterazni inhibitor), rezerpina (antihipertenziv), kofeina (stimulant centralnog nervnog sistema), galantamina (acetilholin esterazni inhibitor), kinina (antimalarik) i drugih (Wink i sar., 2005).

Kako ovi biljni produkti zauzimaju značajan deo farmakopeje, zahtevi za njima su sve veći što je preusmerilo fokus na izolaciju ovih jedinjenja iz *in vitro* gajenih biljaka (Nguyen i sar., 2001; Neumann i sar., 2009; Singh i Tiwari 2010; Zuzarte i sar., 2010). Prednosti produkcije sekundarnih metabolita u *in vitro* gajenim biljakama ogledaju se u pouzdanijoj i predvidljivoj proizvodnji, mogućnosti manipulacije hemijskom i fizičkom mikrosredinom, bržoj i efikasnijoj izolaciji, većem prinosu, odsustvu sporednih jedinjenja koja se sintetišu kod biljaka gajenih u polju kao i u mogućnosti praćenja daljeg metabolizma ovih jedinjenja

zahvaljujući radioaktivnom obeležavanju. Kontrolisanjem mikroklimatskih uslova, dodavanjem prekursora, primenom elicitora ili genetičkom transformacijom utiče se na ekspresiju gena koji čine biosintetski put ciljnog jedinjenja. Dok se mnogi metaboliti uspešno proizvode *in vitro* u nediferenciranim ćelijama kalusa ili suspenziji ćelija, neka jedinjenja zahtevaju veći stepen diferencijacije biljnih tkiva i organa (Dörnenberg i Knorr, 1997). Poslednjih 50 godina u fokus je stavljena *in vitro* produkcija aroma i jestivih boja koje se koriste u prehrambenoj industriji i medicini, nejestivih pigmenta koji se koriste u kozmetici i tekstilnoj industriji, prirodnih bioaktivnih insekticida, mirisnih jedinjenja i etarskih ulja ali i prirodnih lekova i hemoprotektivnih jedinjenja (Karuppusamy, 2009).

Kao objekti istraživanja ove doktorske disertacije korišćene su biljke *T. vulgare* iz prirode kao i gajene *in vitro*. U literaturi postoje oskudni podaci o biološkim aktivnostima sekundarnih metabolita ove vrste kao i o potencijalima *in vitro* gajenja. Ovom disertacijom je detaljnije opisana ova vrsta, pre svega hemijska struktura etarskog ulja i metanolnih ekstrakata, njihova antimikrobna i citotoksična aktivnost. Utvrđen je protkol za *in vitro* mikropropagaciju ove vrste i urađena je hemijska analiza sekundarnih metabolita *in vitro* biljaka. Po prvi put ispitan je efekat isparljivih jedinjenja etarskog ulja *T. vulgare* na indukciju odbrambenih mehanizama krompira gajenog *in vitro*. Insekticidni efekat etarskog ulja ispitan je na larvama gubara (*Lymantria dispar* L.).

### **5.1. Uspostavljanje *in vitro* kulture *T. vulgare*, karakterizacija sekretornih struktura i sekundarnih metabolita *in vitro* biljaka**

Uspešni protokoli za *in vitro* mikropropagaciju pojedinih vrsta roda *Tanacetum* koje proizvode biološki aktivne sekundarne metabolite opisani su u literaturi (Keskitalo i sar., 1995; Stojakowska i sar., 1997; George i sar., 1999; Hitmi i sar., 2000; Rateb i sar., 2007). *T. parthenium* je uspešno mikropropagiran *in vitro* u cilju produkcije partenolida (Brown i sar., 1996, Rateb i sar., 2007). U radu Rateb i saradnika (2007) uspešna mikropropagacija semena *T. parthenium* dobijena je na MS hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 0,2% giberelinske kiseline a eksplantati su dalje gajeni na MS podlogama obogaćenim različitim BRR. Rezultati ovog rada ukazali su da je značajno viša produkcija partenolida postignuta

na podlozi koja je sadržavala 50 g/L glukoze ili fruktoze i 0,5 mg/L BAP. Dalmatinski buhač (*T. cinerariifolium*) je gajen u *in vitro* uslovima radi produkcije bioinsekticida piretrina (Ravishankar i sar., 1989; Barthomeuf i sar., 1996; George i sar., 1999; Hitmi i sar., 2000).

Međutim, u literaturi postoje oskudni podaci o *in vitro* mikropropagaciji vrste *T. vulgare* i o mogućnosti gajenja ove vrste pod kontrolisanim uslovima sa ciljem produkcije bioaktivnih jedinjenja. Banthorpe i Wirz-Justice su još 1972. godine publikovali rezultate uspostavljanja različitih *in vitro* kultura ćelija *T. vulgare* u cilju ispitivanja biosintetskog puta monoterpena i karotenoida. Oni su uspešno gajili ćelije kalusa *in vitro* koristeći tkivo stabla kao primarni eksplantat, na WG hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 2,4-dihlorofenoksisirćetnom kiselinom (2,4-D) i 10% kososovog mleka. U ovom radu je ukazano na to da kulture čiji su primarni eksplantati bili listovi i korenovi nisu opstajale u *in vitro* uslovima. Pored toga, njihov rad je pokazao da se profil monoterpenskih jedinjenja razlikuje u kulturi ćelija *in vitro* u odnosu na intaktnu biljku. Banthorpe i Brown (1989) su polazeći od listova i stabla uspostavili *in vitro* kulturu kalusa *T. vulgare* i *T. parthenium* na MS hranljivoj podlozi uz dodatak 6 ml/L 2,4-D i 10% kokosovog mleka. Autori ove studije su ukazali na to da obe ove vrste gajene *in vitro* ne proizvode značajne količine terpenskih jedinjenja kao roditeljske biljke. Pored toga ova studija je pokazala da su dva kumarina, koja se dominantno proizvode kod biljaka iz kulture *in vitro*, potpuno odsutna kod roditeljskih biljaka. Kesitalo je sa saradnicima 1995. godine objavio protokol za dobijanje protoplasta *T. vulgare* iz kalusa gajenog *in vitro*. U ovoj studiji *in vitro* kulture su uspostavljene iz vrhova izdanaka i embriona, na MS hranljivoj podlozi obogaćenoj - naftalensirćetnom kiselinom (NAA) i 6-benzolaminopurinom (BAP). Najbolji rast izdanaka postignut je na podlogama sa 0,1-0,2 mg/L NAA i 0,1-0,2 mg/L BAP. Autori ove studije su ukazali na to da su formiranje kalusa i organogeneza kod *T. vulgare* organ-specifični i zavise od koncentracije BRR. U ovoj studiji kulture kalusa uspostavljene su iz eksplantata lista na MS hranljivoj podlozi obogaćenoj sa visokim koncentracijama NAA (3,0-4,0 mg/L) dok je koncentracija BAP varirala od 1,5-4,5 mg/L. Pored toga, autori su ukazali i na nizak nivo regeneracije izdanaka iz kalusa, usled vitrifikacije, samo 10% izdanaka nije vitrifikovalo i formiralo je korenove nakon transfera na MS hranljivu podlogu bez BRR.



U ovoj doktorskoj tezi *in vitro* kultura *T. vulgare* je uspostavljena iz semena sakupljenog sa biljaka iz prirodnog staništa. Nakon aseptičnog isključivanja na čvrstom BM bez dodatih BRR, semena su klijala u jako visokom procentu (čak 97,8 % od svih postavljenih semena). Visoka klijavost ovih semena mogla bi se povezati sa rezultatima dobijenim i kod mnogih drugih korovskih vrsta kod kojih je produkcija velikog broja semena visokog stepena klijavosti jedna od evolucijom stečenih adaptacija koje im omogućavaju uspešnu kompeticiju sa drugim vrstama za resurse (Jovanović, 1994).

Uspešna mikropropagacija, koja podrazumeva razviće i umnožavanje primordija pupoljaka je početni korak gajenja biljaka *in vitro* u cilju produkcije željenog metabolita. Za nju je najčešće neophodno obogatiti hranljivu podlogu BRR, pre svega auksinima i citokinima (Vinterhalter i Vinterhalter, 1996). Još 1965. godine su Skoog i Miller otkrili da je odnos endogenih nivoa auksina i citokinina važan faktor pri usmeravanju diferencijacije biljnih ćelija u tkiva korena, odnosno izdanka. Veća koncentracija citokinina u odnosu na auksine pospešuje rastenje izdanaka u odnosu na korenove (Sugiyama 1999; Duclercq i sar. 2011), dok višak auksina podstiče rastenje korenova u odnosu na izdanke. Vrsta i koncentracija primenjenih BRR kao i njihov odnos, značajno utiču na rastenje i razviće biljaka tokom mikropropagacije (Neumann i sar., 2009) ali je pokazano da mogu imati i veliki uticaj na produkciju sekundarnih metabolita u ovim biljkama (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Karuppusamy, 2009). S obzirom da je jedna od veoma važnih uloga citokinina da regulišu *de novo* formiranje pupoljaka, kao i oslobađanje pupoljaka od apikalne dominacije (Mok, 1994; Van Staden i sar., 2008) smatra se da je upravo ova grupa BRR od izuzetnog značaja u procesima multiplikacije biljaka *in vitro*. Iako je pokazano da prirodni citokinini, kao što su zeatin i 2-iP (izopenteniladenin) imaju potencijal da indukuju multiplikaciju velikog broja biljnih vrsta (Veach i sar. 2003), sintetički citokinini se ipak mnogo češće koriste, kako zbog više efikasnosti tako i zbog značajno niže cene (Van Staden i sar., 2008). BAP, uz TDZ, predstavlja najčešće korišćeni citokinin u podlogama za indukciju regeneracije *in vitro* iako postoje literaturni podaci da može da dovede do hiperhidriranosti (Bairu i sar., 2007) ili da nepovoljno utiče na rizogenezu i kasniju aklimatizaciju biljaka dobijenih u procesu mikropropagacije (Werbrouck i sar., 1995; Valero-Aracama i sar., 2010) BAP je i dalje najčešće korišćen citokinin. Iako je i u ranije publikovanim radovima

uspešna *in vitro* regeneracija *T. vulgare* i *T. parthenium* dobijena primenom BAP u kombinaciji sa NAA (Keskitalo i sar., 1995; Stojakowska i sar., 1997; Rateb i sar., 2007) u ovoj doktorskoj disertaciji visok nivo *in vitro* multiplikacije izdanaka *T. vulgare* dobijen je primenom samo BAP. Korišćenje više različitih BRR, naročito iz grupe citokinina i auksina, može dovesti do pojave somaklonalnog variranja (Rani i Raina, 2000; Bairu i sar., 2011), koje služi kao izvor novih klonova ili varijanti ali u kulturi *in vitro* često se smatra nepoželjnim naročito kada se za cilj ima klonsko razmnožavanje biljaka i dobijanje uniformnog biljnog materijala radi izolacije sekundarnih metabolita (Bairu i sar., 2011).

Zbog činjenice da je za uspešan proces multiplikacije neophodno empirijski optimizovati uslove gajenja, efekat BAP je testiran primenom nekoliko različitih koncentracija. Pokazano je da je BAP stimulisao multiplikaciju ali istovremeno i uzrokovao redukciju rasta osnovnog izdanaka i to najintenzivnije na najvišim primenjenim koncentracijama od 0,5 i 1,0 mg/L. Keskitalo i saradnici (1995) su pratili rast izdanaka *T. vulgare in vitro* i ukazali da je najintenzivnije rastenje izdanaka postignuto na podlogama sa 0,1-0,2 mg/L NAA i 0,1-0,2 mg/L BAP. Ovi autori su ukazali i na to da se apikalna dominacija glavnog izdanka može inhibirati povećanjem koncentracije BAP u podlozi do 0,5 mg/L.

Za indukciju procesa rizogeneze kod biljaka gajenih *in vitro* najčešće je neophodno u podlogu dodati neki od auksina (Skoog i Miller, 1957). Auksini učestvuju u mnogim razvojnim procesima u biljci. U kulturi tkiva se koriste kao stimulatori ćelijskih deoba a primarni efekat im je u indukciji adventivnih korenova. Ovi BRR u korenu stimulišu deobu ćelija pericikla koje omotavaju centralni cilindar. Ćelija pericikla iz koje se formira začetak korena, deli se periklinom deobom i formira meristemsko ispupčenje koje brzo raste ka periferiji kao već organizovani meristem korena. U stablu se koreni začinju na sličan način u parenhimskim ćelijama kore (Nešković i sar., 2003). Etilen ima sličan efekat na rizogenezu kao i auksini dok citokinini inhibiraju rizogenezu. Mnoge aminokiseline kao i fenolna jedinjenja mogu da modifikuju dejstvo auksina. Pored prirodnih auksina indolsirćetne kiseline (IAA) kao i fenilsirćetne kiseline (PAA) postoji veliki broj sintetičkih auksinskih analoga. To mogu biti indolni derivati (sintetička IAA, indol-3-buterna kiselina-IBA), naftalenski derivati (NAA), naftoksi derivati ( $\beta$ -naftoksisirćetna kiselina-NOAA),

fenoksi derivati (2,4-D, 2,4,5-T) i benzoevi derivati (2,3,6-trihlorbenzoeva kiselina, 2,3,5-trijodbenzoeva kiselina-TIBA). Za sve sintetičke auksine je zajedničko da se odlikuju postojanošću u biljnim tkivima i ne podležu enzimskoj degradaciji kao prirodni auksini (Nešković i sar., 2003). IBA je sintetički auksin koji se često koristi za ožiljavanje jer je IAA često podložna degradaciji u prisustvu fenolnih jedinjenja (Nešković i sar., 2003). Za svaku biljnu vrstu je potrebno utvrditi optimalni protokol za rizogenezu što uključuje izbor sintetičkog auksina koji će biti primenjen, kao i optimalnu koncentraciju i dužinu primene. NAA i IBA su auksini koji se najčešće koriste u kulturi *in vitro* (George i sar., 2008). Izdanci *T. vulgareum* množeni na podlozi sa BAP zbog toga su preneti na medijum obogaćen IBA, koja je jedan od najčešće korišćenih auksinskih indolnih derivata za ožiljavanje (Nešković i sar., 2003). Prisustvo auksina u hranljivoj podlozi je skoro uvek nepohodno radi indukcije rizogeneze i razvića laterarnih korenova (George i sar., 2008). Dodatak IBA u hranljivoj podlozi je pozitivno uticao na formiranje novih korenova ali je ovaj sintetički auksin pokazao negativno dejstvo na izduživanje korena. Mogući razlog toga jeste produkcija etilena indukovana auksinom. Poznato je da akumulacija etilena u kulturi tkiva inhibira rast ćelija meristema korena i može da poremeti transport auksina (George i sar., 2008).

Pregledom dostupne literature nisu pronađeni podaci o *in vitro* gajenju kulture korenova vrsta roda *Tanacetum*. Kultura korenova *T. vulgare* uspešno je uspostavljena u tečnom hranljivom medijumu obogaćenom sa IBA koja je uticala na povećanje biomase gajenih korenova.

U okviru ove disertacije upotrebom MS hranljive podloge obogaćene BRR dobijena je *in vitro* kultura izdanaka i kultura korenova koja je predstavljala uniforman materijal koji je korišćen za karakterizaciju sekretornih struktura kao i hemijsku karakterizaciju sekundarnih metabolita.

Formiranje trihoma je važan element odbrane od herbivora (Karban i Boldwin, 1997; Traw i Dawson, 2002). Step en oštećenja biljke od strane herbivora zavisi od gustine trihoma na listovima (Harer i Elle, 2002; Handley i sar., 2005). Nekoliko studija je pokazalo da uklanjanje trihoma sa listova dovodi do pojačane ishrane i rasteenja insekata (Baur i sar.,

1991; Fordyce i Agrawal, 2001). Pored toga trihomi pojačavaju rezistenciju i prema abiotičkom stresu. Oni podižu toleranciju na sušu (Benz i Martin, 2006), UV zračenje (Skaltsa i sar., 1994), niske temperature (Agrawal i sar., 2004), a mogu i da akumuliraju značajne količine metala (De Silva i sar., 1996; Sarret i sar., 2006). Pokazano je da jasmenska kiselina pored toga što reguliše odbrambeni odgovor indukovano herbivorima, utiče i na formiranje trihoma (Boughton i sar., 2005., Tian i sar., 2015). Van Schie i saradnici (2007) su pokazali da prskanje biljke paradajza jasmonskom kiselinom može da indukuje emisiju terpena.

Iako je u literaturi često opisan slučaj da se kod *in vitro* gajenih biljaka smanjuje ili čak u potpunosti gubi prisustvo trihoma, a samim tim i sinteza sekundarnih metabolita (Falk i sar., 1990), na listovima *in vitro* gajenih biljaka *T. vulgare* formirao se veliki broj mehaničkih i glandularnih trihoma. Prisustvo i mehaničkih i glandularnih trihoma je karakteristično za predstavnike familije *Asteraceae* kojoj pripada ova vrsta (Ciccarelli i sar., 2007). Ipak, zanimljivo je da u dostupnoj literaturi ne postoje podaci o prisustvu bilo kakvih žlezdanih struktura kod *in vitro* gajenih biljaka *T. vulgare*. Analiza površine lista svetlosnom i skenirajućom elektronskom mikroskopijom u ovom radu pokazala je prisustvo glandularnih trihoma, koje su okarakterisane kao biserijalne i zastupljene su kako na epidermisu lica tako i na naličju lista, okružene velikim brojem dugačkih mehaničkih trihoma.

Pošto je površina epidermisa prva barijera između patogena i herbivora u pohodu na biljku, uloga mehaničkih trihoma je da ometaju kretanje patogena i herbivora, dok glandularne trihome sadrže toksične ili lepljive supstance dodajući fizičkoj i hemijsku barijeru. Ove žlezdane tvorevine imaju kapacitet da proizvode i skladište velike količine različitih klasa sekundarnih metabolita (Schillmiller i sar., 2008). Trihome proizvode i akumuliraju terpena, fenilpropanoide, flavonoide, metil-ketone, šećere i neke odbrambene proteine (Glas i sar., 2012). EST biblioteke (eng. *Expressed Sequence Tag*) sa sekvencama mRNK iz izolovanih trihoma zajedno sa proteomičkim i metabolomičkim podacima daju odličan uvid u biosintezu sekundarnih metabolita u trihomima (Tissier, 2012a). Ova jedinjenja se najčešće akumuliraju u subkutikularnom prostoru različite veličine koji nastaje kada se dva sloja

kutikule odvoje od pektino-celuloznog ćelijskog zida (Fahn, 2000). Analize EST biblioteka ukazuju na to da su trihome prilično autonoman sa veoma intenzivnim metaboličkim procesima (Schillmiller i sar., 2008).

Neki od metabolita koji se mogu naći u trihomama su postali komercijalno značajni kao biopesticidi, aditivi ili farmakološki aktivni konstituenti (Duke i sar., 2000). Razvijeni su i mnogi protokoli za laku i efikasnu izolaciju trihoma sa površine listova (Marks i sar., 2008). Poslednjih godina trihomama je posvećena posebna pažnja u svetlu primene genetičkog inženjeringa u svrhu modifikacije sinteze specifičnih metabolita (Lange i sar., 2011, Tissier i sar., 2012b., Sultana i sar., 2015). Impresivan napredak ostvaren je u identifikaciji promotora za trihom-specifičnu ekspresiju transkripata (Tissier i sar., 2012b). Ovi promotori su od velikoj značaja za metabolički inženjering u cilju modulacije zastupljenosti transkripta nekog specifičnog terpena ili regulatornog gena kod transgenih biljaka. Pokazano je da je promotor za trihom-specifičnu CBT-ol (cembratrienol) hidroksilazu, koji je jedan od prvih izolovanih trihom-specifičnih promotora i još nekoliko *cis*-regulatornih elemenata CBT-sintaze koji su identifikovani kod *Nicotiana sylvestris*, potrebno za specifičnu ekspresiju u sekretornim ćelijama glandularnih trihoma (Ennajdaoui i sar., 2010). Promotori za CBT-ol sintazu su korišćeni za produkciju novih diterpena i heterolognih seskviterpena kod *N. sylvestris* (Rontein i sar., 2008; Sallaud i sar., 2009). Liu i saradnici (2011) su identifikovali transkripcione faktore koji regulišu ekspresiju gena koji u glandularnim trihomama roda *Artemisia* učestvuju u biosintezi terpena. U cilju identifikacije regulatornih elemenata koji kontrolišu ekspresiju hrizantemol sintaze kod *Tanacetum cinerariifolium* (TcCHS), koji predstavlja prvi enzim u biosintezi piretrina, TcCHS promotor je kloniran i fuzionisan sa GFP (eng. *Green Fluorescent Protein*) i GUS (eng. *β-glucuronidase*) reporter genima i transformisan u *Chrysanthemum morifolium* i *Nicotiana tabacum* (Sultana i sar., 2015). Autori ove studije su utvrdili da se TcCHS promotor eksprimira isključivo u sekretornim ćelijama glandularnih trihoma kod obe vrste. Ovi podaci mogu biti vrlo korisni za trihom-specifičan metabolički inženjering i akumulaciju komercijalno popularnog botaničkog insekticida piretrina.

Hemijska karakterizacija glandularnih trihoma predstavnika roda *Tanacetum* gajenih *in vitro* pokazala je širok spektar različitih jedinjenja koja se sintetišu i skladište u velikim koncentracijama. Kod vrste *T. cinerariifolium* u glandularnim trihomama se sintetiše piretrin koji se može preneti i do semena omogućavajući klijancima, koji inače ne poseduju trihome, zaštitu od patogenih gljiva i herbivora (Ramirez i sar., 2012). U radu Brown i saradnika (1999) pokazano je da je kod F1 generacije seksualnog hibrida *T. vulgare* i *T. parthenium*, broj i tip glandularnih trihoma nasleđen od *T. vulgare* dok je profil sekundarnih metabolita iako sličan roditeljskim sadržavao i neka nova jedinjenja koja nisu bila prisutna kod roditeljskih linija. Ranije je pokazano da su glandularne trihome *T. parthenium* mesto sinteze bioaktivnog metabolita partenolida (Majdi i sar., 2011). Histoheimijskim bojenjima u ovoj disertaciji pokazano je da je glandularna sekrecija *in vitro* biljaka *T. vulgare* bogata pre svega lipidnim i terpenskim komponentama koje su i potvrđene gasno-masenom analizom kao konstituenti etarskog ulja *in vitro* biljaka međutim profil sekundarnih metabolita se razlikovao u odnosu na biljke iz prirode.

Biljne ćelije, tkiva, organi i kulture gajeni u *in vitro* uslovima imaju kapacitet da sintetišu iste metabolite kao biljka od koje su potekli. Međutim često se dešava da biljke gajene *in vitro* ne proizvode željeno jedinjenje pri čemu je jedan od glavnih uzroka nedovoljno poznavanje metabolizma i biosintetskog puta tog metabolita. Takođe, određeni metaboliti zahtevaju veći stepen diferencijacije *in vitro* tkiva, organa i kultura ili je njihova sinteza vezana za specijalizovane ćelije ili ćelije u određenoj fazi razvoja (Dörnenberg i Knorr, 1997).

U dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci o fitohemijskoj karakterizaciji *in vitro* biljaka *T. vulgare*. Analiza metanolnih ekstrakata herbe i korena *in vitro* biljaka *T. vulgare* pokazala je kvalitativnu i kvantitativnu razliku u sadržaju metabolita u odnosu na metanolne ekstrakte biljaka iz prirode. HPLC analiza pokazala je prisustvo fenola i fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima *in vitro* biljaka pri čemu su ova jedinjenja bila sa različitim relativnom zastupljenošću prisutna u odnosu na ekstrakte biljaka iz prirode. Posebno je interesantno da je u metanolnom ekstraktu korena gajenog *in vitro* relativna zastupljenost 3,5-*O*-dikefeolihininske kiseline (3,5-*O*-DQCA) bila i 7 puta veća nego u

metanolnim ekstraktima herbe i korena biljaka iz prirode. Ovo je značajan podatak s obzirom na to da ova kiselina ispoljava brojne biološke aktivnosti. Ranije studije su ukazale na da se mogući fiziološki mehanizam cele familije kafeoilhininskih kiselina ostvaruje preko mono- i di-kafeoilhininskih (DCQA) kiselina. Imunomodulatorna i hepatoprotektivna aktivnost mono- i di-CQA se ostvaruje pomoću njihove antioksidativne sposobnosti (Peluso i sar., 1995; Tatefuji i sar., 1996; Basnet i sar., 1996). Juan-Badaturuge i saradnici (2009) su izolovali 3,5-O-DQCA iz metanolnog ekstrakta *T. vulgare* i ukazali na antioksidativnu aktivnost ove kiseline koja je bila na nivou kvercetina koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Važno je istaći podatak da je DCQA HIV-1 IN inhibitor odnosno da ova kiselina u netoksičnim koncentracijama inhibira integraciju virusa humane imunodeficijencije (HIV-1) i blokira njegovu replikaciju *in vitro* (Robinson i sar., 1996; Zhu i sar., 1999). Prekursori ove kiseline, hininska, kafeinska i hlorogena kiselina ne ispoljavaju aktivnost prema HIV-1 *in vitro* (Zhu i sar., 1999). HIV-1 integraza je ključni enzim koji učestvuje u replikaciji virusa i omogućava njegovu integraciju u genom domaćina. Inhibicija aktivnosti integraze stoga je odlična meta za terapijske lekove (King i sar., 1998). Zbog toga su DCQA ali i tri-kafeoilhininska kiselina (TCQA) glavna jedinjenja za razvoj novih antiretrovirusnih lekova (Tamura i sar., 2006). Tamura i saradnici (2006) su ustanovili da su glavni metaboliti iz *in vitro* ćelija kalusa salate (*Lactuca sativa* var. *crispa* L.) 3,5-DCQA i 3,4,5-TCQA pri čemu je količina 3,5-DCQA u *in vitro* biljkama bila 3 puta veće nego u intaktnim biljkama dok je 3,4,5-TCQA u intaktnim biljkama potpuno odsustvovala. Izolacijom ovih jedinjenja iz *in vitro* kalusa i testiranjem njihove anti-HIV aktivnosti autori su ukazali na to da su DCQA i TCQA ispoljile aktivnost na niskim koncentracijama i da ova jedinjenja imaju veliki terapijski potencijal kad su u pitanju HIV infekcije (Tamura i sar., 2006). Pore toga oni su ukazali i tu mogućnost da bi *in vitro* gajene biljke mogle da obezbede dostupnost ovih jedinjenja bez obzira na klimatsku sezonu.

## 5.2. Hemijski sastav etarskog ulja i metanolnih ekstrakata

Familija *Asteraceae*, kojoj pripada *T. vulgare* obuhvata vrste bogate sekundarnim metabolitima i etarskom uljima čija se biosinteza i akumulacija odigravaju u najvećoj meri

u biserijatnim glandularnim trihomama, tipičnim za pripadnike ove porodice (Metcalf and Chalk 1950). Iako se smatra da su seskviterpeni tipični konstituenti etarskog ulja većine vrsta porodice Asteraceae (Seaman 1982) i da se koriste kao hemotaksonomska karakteristika porodice (Seaman 1982, Zdero and Bohlmann 1990), kod vrsta roda *Tanacetum* to ne mora da bude tako.

U ovoj disertaciji ispitan je sastav etarskih ulja biljaka *T. vulgare* sakupljenih u prirodi kao i gajenih *in vitro*. GC/MS analiza ulja dobijenog iz herbe biljaka iz prirode pokazala je da većina isparljivih komponenti etarskog ulja spada u grupu oksidovanih monoterpena dok su manje zastupljena jedinjenja po svojoj strukturi monoterpeni ili aromatični ugljovodoni. Samo mali broj komponenti su manje isparljivi oksidovani seskviterpeni i seskviterpeni ugljovodoni.

U literaturi je od ranije poznato da prinos i sastav etarskog ulja *T. vulgare* veoma varira i da zavise od velikog broja faktora koji mogu da utiču na njihovu sintezu, kao što su sezona sakupljanja biljaka (Cornu i sar., 2001), geografska lokacija staništa (Maffei i sar., 1994), pH zemljišta (Alvarez-Castellanos i Pascual-Villalobos, 2003), uslovi sušenja (Tateo i Riva, 1991), genotip (Nori-Shargh i sar., 1999; Keskitalo i sar., 2001) deo biljke iz kojeg se ulje ekstrahuje i metode ekstrakcije (Scalia i sar., 1999). Prinos etarskog ulja od 0,32 %, dobijen u ovom radu, bio je u skladu sa dosadašnjim podacima iz literature (Rohloff i sar., 2004; Dragland i sar., 2005). Od ranije je poznato da se veći deo etarskog ulja akumulira u cvetovima i listovima, a da stablo sadrži neznatni deo ulja (Dobos i sar., 1992).

U zavisnosti od dominantne komponente ulja do sada je opisano čak 23 hemotipa *T. vulgare* (Lawrence, 2000). Snažno definisani hemotipovi su oni kod kojih je dominantno jedinjenje u etarskom ulju zastupljeno sa preko 40% (Holopainen 1989). Dominantno jedinjenje u analiziranom etarskom ulju biljaka iz prirode bilo je *trans*-hrizantenil acetat (41.4%) te je ulje okarakterisano ovim hemotipom. Smatra se da je postojanje hemotipova evoluiralo tokom vremena kao odgovor na specifične uslove životne sredine sa kojima se biljke tokom života suočavaju (Lahlou i Berrada, 2003). Pored toga postojanje hemotipova manifestuje razlike koje postoje u genomu biljke. U Evropi su najzastupljeniji tujonski, kamforski, cineolski, hrizantenilni, artemizijski i umbelulonski hemotip *T. vulgare*



(Holopainen i Kauppinen, 1989; Keskitalo i sar., 2001; Mockute i Judzentiene, 2004; Rohloff i sar., 2004; Dragland i sar., 2005; Judzentiene i Mockute 2005). U okviru sistemskog istraživanja etarskog ulja vrsta roda *Tanacetum* koje su prisutne u flori Srbije analizirano je etarsko ulje *T. vulgare* sa 8 lokaliteta (Popov i sar., 2001). Etarsko ulje sa lokaliteta Bor, Deligrad i Aleksinac karakterisalo se  $\beta$ -tujonskim hemotipom, etarsko ulje sa lokaliteta Sevce i Aradac imalo je dominantnu kamforsku komponentu, *trans*-hrizantenil acetat je bila dominantna komponenta u etarskom ulju sa lokaliteta Stig i Brezovica dok je etarsko ulje sa lokaliteta Zlatar sadržavalo hrizantenol i *trans*-hrizantenil acetat kao komponente koje su sa preko 40% zastupljene u etarskom ulju.

Za razliku od etarskog ulja biljaka iz prirode u čijem sastavu su dominirali monoterpeni (97%), etarsko ulje *in vitro* biljaka *T. vulgare* karakterisalo se ujednačenim prisustvom monoterpena (40%) i seskviterpena (33,2%). Svi monoterpeni identifikovani kod *in vitro* biljaka bili su prisutni i u etarskom ulju biljaka iz prirode dok su seskviterpenska jedinjenja bila daleko zastupljenija i raznovrsnija kod *in vitro* biljaka. *trans*-Tujon kao dominantno jedinjenje (22,7%) u etarskom ulju *in vitro* biljaka bilo je zastupljeno sa samo 9% u etarskom ulju biljaka iz prirode. Takođe, kamfor je u etarskom ulju *in vitro* biljaka bio zastupljeniji (10,1%) u odnosu na etarsko ulje biljaka iz prirode (5%) dok neril-izovalerat kao dominantni seskviterpen u etarskom ulju *in vitro* biljaka (20,6%) nije identifikovan u ulju biljaka iz prirode.

Etarska ulja nisu konstantna mešavina ni u kvalitativnom ni u kvantitativnom smislu. Ona se konstantno menjaju u zavisnosti od uslova sredine kojima je biljka izložena. Varijacija u sastavu etarskih ulja *in vitro* biljaka u odnosu na biljke iz prirode može se objasniti, između ostalog i različitom ontogenetskom fazom biljaka iz kojih su etarska ulja izolovana jer su se *in vitro* biljke nalazile u juvenilnoj fazi za razliku od biljaka iz prirode. Avato i saradnici (2005) veću zastupljenost kamfora u mikropropagiranim biljkama *S. officinalis* u odnosu na roditeljske biljke gajene u polju objašnjavaju korelacijom sa mlađim stupnjevima razvića propagiranih biljaka, oslanjajući se na ranije radove Croteau i saradnika (1981, 1987) koji su pokazali da se zastupljenost kamfora u ulju smanjuje sa starošću biljke. Avato i saradnici (2005) takođe ukazuju i na nisku zastupljenost monoterpena i visoku zastupljenost

seskviterpena kod mladih biljaka i napominju da se sinteza seskviterpena odvija kasnije u biosintetskom putu i da starost *in vitro* biljaka ukazuje na trenutak kada preferencijalno dolazi do sinteze ovih jedinjenja. Potvrdu ovih tvrdnji autori nalaze i u povećanju gustine glandularnih trihoma kod *in vitro* biljaka što ukazuje na podmlađivanje germplazme usled gajenja *in vitro*.

Etarsko ulje *in vitro* gajenih biljaka *Micromeria pulegium* bilo je bogatije seskviterpenskim jedinjenjima u odnosu na ulje biljaka iz prirode dok su oba ulja dominantno sadržavala monoterpena jedinjenja (Stojičić i sar., 2016). U ovom radu je ukazano na to da je zastupljenost seskviterpena naročito porasla kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi obogaćenoj sa BA. I drugi autori su naznačili da na produkciju sekundarnih metabolita može drastično da utiču različiti regulatori rastevanja u hranljivoj podlozi (Affonso i sar., 2009; Grzegorzcyk-Karolak i sar., 2015). Pored toga, tip biljnog materijala može da utiče na sastav etarskog ulja (Figueiredo i sar., 2008). Etarsko ulje *in vitro* biljaka je izolovano iz mladih biljaka i to iz stabla i listova dok su za izolaciju etarskog ulja biljaka iz prirode korišćene cele biljke u fazi cvetanja. Isti autori su ukazali i na to da faza razvića u kojoj se nalazi biljni materijal može određivati sadržaj isparljivih jedinjenja u ulju. Prema tvrdnjama Máñez i saradnika (1991) starenje biljnog organa iz koga se izoluje etarsko ulje je u korelaciji sa većim nivoom ciklizacije i dehidratacije komponenti ulja. Interesantno je i da vrste sa unutrašnjim sekretornim strukturama imaju stabilniji sastav etarskog ulja dok je sastav etarskog ulja vrsta sa spoljnim sekretornim strukturama, kakve su glandularne trihome, podložniji promeni usled sekrecije komponentata tokom sazrevanja (Figueiredo i sar., 2008). Takođe, Gershinzon i saradnici (1989) su ukazali na to da faza razvića trihoma utiče na koncentraciju monoterpena u njihovom sekrecionom sadržaju. Opšte je prihvaćena tvrdnja da sinteza etarskih ulja u velikoj meri zavisi od uslova u kojim biljka raste kao što su temperatura, svetlosni režim i dostupnost nutrijenata (Gleadow i Woodrow 2002; Ballhorn i sar. 2011). Pored toga, još jači uticaj sredine kao što je izloženost biljaka različitim vrstama stresa utiče na metaboličke puteve konstituenata etarskih ulja (Bohnert i sar., 1995). Biljke u prirodi su pri tome izložene i različitim interakcijama stresnih faktora pa tako jači intenzitet svetlosti dovodi do povećanja temperature lista a suša do povećane koncentracije soli u zemljištu što uzrokuje brojne fiziološke promene uključujući i sintezu

sekundarnih metabolita. Tako kod biljaka *Salvia officinalis* izloženih umerenoj suši dolazi do znatnog povećanja koncentracije monoterpena (Nowak i sar., 2010) što je uočeno i kod vrsta *Picea abies* i *Pinus silvestris* (Turtola i sar., 2003). Bettaieb i saradnici (2009) su ispitivali uticaj vodnog stresa na sastav etarskog ulja biljaka *Salvia officinalis* gajenih u stakleniku i uočili da umeren vodeni stres (50%) odnosno suša dovodi do značajnog povećanja zastupljenosti monoterpena u ukupnom sadržaju etarskog ulja. Ove činjenice potvrđuju teoriju da je sinteza terpena favorizovana delovanjem stresnih faktora sredine. Varijabilnost u sastavu etarskog ulja biljaka iz prirode u odnosu na etarsko ulje *in vitro* biljaka moglo bi da se objasni i kompleksnim biotičkim faktorima. Biljke u prirodi u poređenju sa biljkama gajenim *in vitro* su izloženi različitim vrstama stresa, uključujući i različite patogene i herbivore što će, imajući u vidu njihove kompleksne interakcije, delovati na sekundarne metabolite koji će biti sintetisani u ovim uslovima.

Hemijskom analizom metanolnih ekstrakata cveta, lista, stabla i korena biljaka *T. vulgare* sakupljenih iz prirode pokazano je prisustvo fenolnih kiselina i flavonoida, pri čemu su svi ekstrakti bili bogatiji fenolnim kiselinama nego flavonoidima. U svim metanolnim ekstraktima su dominirale fenolne kiseline koje su derivati hidroksi cimetine- neohlorogena, dikafeoilhininska i 3,5-*O*-dikafeoilhininska kiselina. Profil flavonoida se razlikovao u zavisnosti od tkiva iz kojeg su ekstrahovani. Izokvercetin je bio najzastupljeniji flavonoid u metanolom ekstraktu cveta dok je u ostalim ekstraktima dominirao luteolin-7-glukozid. Nepetin, kvercetagetin-3,6-dimetiletar, hispidulin i eupalitin su detektovani samo u metanolnom ekstraktu izolovanom iz lista. Vrste i zastupljenost fenolnih jedinjenja kod vrsta roda *Tanacetum* se razlikuje u zavisnosti od tipa rastvarača kao i korišćenih metoda za analizu. Analiza polifenolnih jedinjenja u okviru vrsta ovog roda pokazala je prisustvo luteolina, apigenina, rutina, kafeinske i ferulinske kiseline (Esmaeili i sar., 2010). Kod vrste *T. vulgare* detektovano je prisustvo 3,5-*O*-dikafeoilhininske kiseline, aksilarina i luteolina (Juan-Badaturuge i sar., 2009) kao i kafeinske, neohlorogene i ferulinske kiseline (Wojdylo i sar., 2007). Rezultati u ovoj disertaciji potvrđuju da je 3,5-*O*-dikafeoilhininska kiselina dominantno jedinjenje u metanolnim ekstraktima biljaka *T. vulgare* sakupljenih u prirodi i gajenih *in vitro* dok je neohlorogena kiselina identifikovana kao drugo dominantno jedinjenje. Kvercetagetin 3,6-dimetil etar je u okviru ove disertacije identifikovan u

metanolnom ekstraktu lista biljaka *T. vulgare* sakupljenih u prirodi. Ovo jedinjenje je pored hrizoeriola, apigenina i 6-hidroksiluteolina ranije detektovano u listu i cvetu *T. vulgare* (Williams i sar., 1999a, 1999b).

Pored aromatičnih isparljivih komponenti *T. vulgare* je bogat izvor fenolnih jedinjenja. Spektrofotometrijski određena količina ukupnih fenola prisutnih u metanolnim ekstraktima cveta, lista, stabljike i korena *T. vulgare* ukazala je na razlike u sadržaju ove grupe jedinjenja među ekstraktima različitog tipa biljnog tkiva). Ovo je prvi put da je određivan sadržaj fenolnih jedinjenja odvojeno u cvetu, listu, stabljici i korenu ove vrste. Metanol je korišćen kao rastvarač jer su raniji radovi pokazali da je to najbolje ekstrakciono sredstvo za fenole i flavonoide kod ove vrste (Stojković i sar., 2014). U okviru ove teze pokazano je da se metanolni ekstrakt korena odlikovao najvećim sadržajem ukupnih fenola u odnosu na ostale metanolne ekstrakte. Međutim, sadržaj ukupnih fenola određen u okviru ove teze unekoliko se razlikovao od ranije objavljenih podataka u literaturi za *T. vulgare* i druge vrste roda *Tanacetum* (Wojdylo i sar., 2007; Esmaeili i sar., 2010; Baranauskienė i sar., 2014; Stojković i sar., 2014).

Ranija istraživanja na aromatičnim biljkama ukazuju da vrste bogate fenolnim jedinjenjima predstavljaju dobar izvor prirodnih antioksidanata. Mnogi autori su ukazali na linearnu korelaciju između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta (Cai i sar., 2004; Katsube i sar., 2004; Katalinić i sar., 2006; Esmaeili i sar., 2010; Stojković i sar., 2014) dok su neki autori potvrdili tu korelaciju kod biljaka unutar jedne familije ili grupe (Wu i sar., 2004; Wojdylo i sar., 2007). U ovoj disertaciji takođe je pokazano da fenolna jedinjenja doprinose u velikoj meri biološkim aktivnostima ekstrakata pre svega njihovom antioksidativnom dejstvu.

### 5.3. Antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata

Antioksidansi su organski molekuli koji sprečavaju ili usporavaju procese oksidacije drugih molekula u živim sistemima a time i genezu slobodnih radikalskih grupa koji u lančanim reakcijama mogu da dovedu do oštećivanja ćelijskih struktura. Zbog potencijala da

redukuju oksidativni stres u ćelijama ova jedinjenja se danas koriste u preventivnoj medicini ili su već zauzela značajno mesto u tretmanima različitih oboljenja kod ljudi uključujući karcinom, kardiovaskularna i neurodegenerativna oboljenja, kao i upalne procese (Gerber i sar., 2002; Di Matteo i Esposito, 2003). Među najefikasnijim antioksidansima ističu se jedinjenja izolovana iz različitih lekovitih i začinskih biljaka, poput vitamina C, vitamina E, karotena, ksantofila i tanina. Visokim antioksidativnim potencijalom odlikuju se i druga jedinjenja biljnog porekla u koje spadaju različite fenolne kiseline (galna, kafeinska, ruzmarinska kiselina) i flavonoidi (kvercetin, katehin) (Wright i sar., 2001; Shan i sar., 2005). Zbog toga se ova jedinjenja često koriste kao dodaci u ishrani postajući tako deo preventivne medicine (Knekt i sar., 1996). S druge strane, sintetički antioksidansi koji se danas koriste u velikoj meri u prehrambenoj industriji kao što su butil hidroksi toluen (BHT) i butil hidroksi anisol (BHA) mogu uzrokovati oštećenja jetre i ogenezu (Grice 1988; Park i sar., 1990). Ovo je još jedan od razloga za sve veći interes za prirodne antioksidanse biljnog porekla.

Rezultati analiza hemijskog sastava metanolnih ekstrakata različitih delova biljaka *T. vulgare* pokazali su da su upravo fenolne kiseline i flavonoidi zajedno sa njihovim derivatima najzastupljeniji konstituenti ekstrakata te se pretpostavilo i da bi antioksidativni potencijal ovih ekstrakata mogao biti značajan. Korišćenjem stabilnog organskog radikala DPPH, određena je antioksidativna aktivnosti metanolnih ekstrakata stabla, lista, cveta i korena. Preko DPPH testa određuje se sposobnost jedinjenja iz ekstrakta da budu donori vodonikovog atoma dok se testom redukujućeg potencijala procenjuje njihova sposobnost da doniraju elektron (Katalinić i sar., 2006).

Antioksidativna aktivnost svih metanolnih ekstrakata analiziranih u ovoj disertaciji bila je veća nego ranije pokazana aktivnost metanolnih i etanolnih ekstrakata vrsta roda *Tanacetum* (Tepe i Sokmen, 2007; Esmaeili i sar. 2010). U radu Juan-Badaturuge i saradnika (2009) antioksidativna aktivnost sirovog ekstrakta *T. vulgare* ispitana preko DPPH testa iznosila je  $IC_{50}=37 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ . Autori ove studije su izvršili fracionisanje aktivnih jedinjenja iz ovog ekstrakta i pokazali da on sadrži 3,5-*O*-dikafeoilhininsku kiselinu, aksilarin i luteolin kao antioksidativne konstituente pri čemu je 3,5-*O*-

dikafeoilhininska kiselina ispoljila antioksidativnu aktivnost sličnu kvercetinu koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Ovim istraživanjem autori su pružili podršku upotrebi *T. vulgare* u tradicionalnoj medicini u tretmanima za zarastanja rana, reumatidni artritis i druga inflamatorna stanja (Juan-Badaturuge i sar., 2009). I prema Baranauskiene i saradnicima (2014) nosioci antioksidativne aktivnosti vodenog ekstrakta *T. vulgare* su mono- i dikafeoilhininske kiseline. Bączek i saradnici (2017) su ispitivali i upoređivali antioksidativni potencijal vodenog-etanolnih ekstrakata *T. vulgare* i *T. balsamita* pomoću DPPH testa i utvrdili da *T. vulgare* ispoljava jaču antioksidativnu aktivnost. U ovom radu istaknuto je da su nosioci ove aktivnosti pre svega fenolne kiseline i to kafeinska, ruzmarinska i ferulinska.

U rezultatima ove doktorske teze oba korišćena testa su pokazala da metanolni ekstrakt korena poseduje najveći antioksidativni kapacitet. Ovaj ekstrakt sadržavao je najviše ukupnih fenola, a relativna zastupljenost fenolnih kiselina, neohlorogene, 3,5-*O*-dikafeoilhininske i dikafeoilhininske, bila je najveća u odnosu na ostale ekstrakte. Wojdylo je sa saradnicima (2007) ukazao na to da je antioksidativna aktivnost *T. vulgare* rezultat aktivnosti fenolnih kiselina i to pre svih derivata kafeoilhininske kiseline. Pokazano je i da su dikafeoilhininska kiselina i njeni derivati jako dobri "hvatači" slobodnih radikala i helatori jona metala (Kayano i sar. 2002; Hung i sar., 2006) te da je njihov antioksidativni potencijal veći nego nekih jedinjenja koja se danas najčešće koriste kao antioksidansi, kao što su vitamin C, vitamin E i kafeinska kiselina. S druge strane poznato je da je neohlorogena kiselina izomer hlorogene kiseline i da obe ispoljavaju jaku antioksidativnu aktivnost kroz heliranje jona metala, sprečavanje lipidne peroksidacije i eliminaciju slobodnih radikala (Kim i sar., 2003). Pored toga, pokazano je da neohlorogena kiselina smanjuje oksidaciju lipoproteina niske gustine (LDL, eng. *Low Density Lipoproteins*) za 86-97% (Fang i sar., 2002). Ovo je značajno iz razloga što povećanje LDL u krvi ubrzava formiranje aterosklerotičnih plaka koje dovode do srčanog udara i infarkta. Oksidacija LDL delovanjem slobodnih radikala u crevima je glavna modifikacija koja vodi ka ranom formiranju lezija (Chu i Liu, 2005). Oksidovani LDL brže dovodi do aterogeneze nego LDL zbog čega su jedinjenja koja smanjuju oksidaciju ovih molekula vrlo značajna za

prevenciju kardiovaskularnih obolenja i podstiče se njihov unos kroz voće, povrće i suplemente u ishrani.

Visoku antioksidativnu aktivnost pokazao je i metanolni ekstrakt cveta iako je on imao manji sadržaj ukupnih fenola nego metanolni ekstrakt lista. Međutim hemijska analiza je pokazala da je u ekstraktu cveta prisutan izokvercetin, koji nije detektovan u ostalim ekstraktima već je u njima dominantni flavonoid bio luteolin-7-glukozid. Prema studiji Mishra i saradnika (2003) flavonoidni glikozidi ispoljavaju slabiju antioksidativnu aktivnost nego njihovi aglikoni. Ranije je ukazano na antioksidativnu sposobnost izokvercetina (Wang i sar., 2013). Premda je izokvercetin glikozid, kao i luteolin-7-glukozid, njegova struktura je takva da poseduje više hidroksilnih grupa što doprinosi povećanju antioksidativne aktivnosti (Rice-Evans i sar., 1997; Seyoum i sar., 2006). Zbog toga se može tvrditi da izokvercetin uveliko doprinosi antioksidativnoj aktivnosti metanolnog ekstrakta cveta *T. vulgare*.

Zahvaljujući prisustvu jedinjenja sa pokazanim visokim antioksidativnim potencijalom, smatra se da bi ovi ekstrakti mogli ispoljiti različite biološke aktivnosti, te je u daljem radu testirano njihovo antimikrobno i antiogeno dejstvo.

#### **5.4. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja i metanolnih ekstrakata**

Američko Društvo za infektivne bolesti (2004) objavilo je podatak da od 2 miliona ljudi koji godišnje budu inficirani nekim od patogena u američkim bolnicama, čak u 70% slučajeva su to patogeni koji su rezistentni na makar jedan od antimikrobnih lekova. Kontinuirano istraživanje i ispitivanje antimikrobnih agenasa je stoga od velike važnosti za očuvanje javnog zdravlja. Poslednjih decenija poraslo je interesovanje za biljne ekstrakte, etarska ulja ili izolovana jedinjenja sa izraženim antimikrobnim aktivnostima.

U okviru ove disertacija mikrodilucionom metodom ispitana je antimikrobna aktivnost etarskog ulja i metanolnih ekstrakata cveta, lista, stabljike i korena *T. vulgare* na osam vrsta bakterija i osam vrsta gljiva.

Etarsko ulje je pokazalo izuzetno jaku antimikrobnu aktivnost, jaču od korišćenih referentnih antibiotika prema Gram (-) *E.coli* i *Enterobacter cloacae*. Značaj dobijenih rezultata može se proceniti kada se ima u vidu da ove bakterije mogu dovesti do ozbiljnih zdravstvenih tegoba koje mogu imati čak i letalan ishod. *E.coli* i *Enterobacter cloacae* su uz *K. pneumoniae* najčešći uzročnici teških bolničkih infekcija (Potron i sar., 2013; Jarlier i INVS, 2014). Tako *E. coli* može izazvati kako intestinalne infekcije, infekcije urinarnog trakta, ali i meningitis (Levine, 1984), dok oportunistička i multirezistentna vrsta *E. cloacae* izaziva endokarditis, osteomijelitis, infekcije kože i mekih tkiva kao i infekcije donjeg respiratornog i urinarnog trakta (Fata i sar., 1996). S druge strane, etarsko ulje je pokazalo značajno umereniju aktivnost prema Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Micrococcus flavus*, dok su Gram (+) *Listeria monocytogenes* kao i Gram (-) *Pseudomonas auruginosa* su pokazale najmanju osetljivost.

I ranije je ukazano na to da etarska ulja vrsta *T. densum*, *T. margenteum* i *T. praeteritum* ispoljavaju visoku antibakterijsku aktivnost koja je pripisivana pre svega seskviterpenskim laktonima (Gören i sar., 1992, 1996a, 1996b). Etarsko ulje *T. parthenium* pokazalo je najjaču aktivnost prema *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*, ali je ta aktivnost bila slabija od korišćene pozitivne kontrole (Polak i sar., 2010). U radu Mikulašova i saradnika (2009) analizirano je i upređivano antimikrobno dejstvo etarskih ulja *T. vulgare* i *Salvia sp.* izolovanih iz biljaka iz prirode sakupljenih sa više lokacija. Etarska ulja obe vrste pokazala su jače dejstvo prema Gram (+) bakterijama u odnosu na Gram (-). U ovom radu je pokazano da različiti hemotipovi etarskih ulja *T. vulgare* i *Salvia sp.* ispoljavaju različit stepen antimikrobnog dejstava a najosetljivije vrste bile su *B. cereus* i *Candida albicans*. Autori ovog istraživanja su zaključili da je hemijska varijabilnost etarskog ulja dovoljan razlog za ispoljavanje različitog stepena antimikrobne aktivnosti. Baćzek i saradnici (2017) su ispitivali antibakterijsko dejstvo etarskih ulja *T. vulgare* i *T. balsamita*. Etarsko ulje *T. vulgare* koje se karakterisalo *trans*-hrizantenil acetatnim hemotipom pokazalo je slabije antimikrobno dejstvo u poređenju sa etarskim ulje *T. balsamita* koje je imalo  $\beta$ -tujon kao dominantno jedinjenje u ulju. U ovoj studiji etarsko ulje *T. vulgare* nije ispoljilo inhibitornu aktivnost prema Gram (-) bakterijama dok su od Gram (+) bakterija najosetljivije bile *B. cereus*, *B. subtilis* i *S. epidermiditis*. Autori su zaključili da je razlika u ispoljenoj



antibakterijskoj aktivnosti rezultat različitog hemijskog sastava ulja a pre svega različite zastupljenosti  $\beta$ -tujona u etarskom ulju obe vrste.

Smatra se da antimikrobno dejstvo i mehanizam dejstva etarskog ulja zavise od komponenti ulja, njihove zastupljenosti i hemijske strukture (Nazzaro i sar., 2013). Ponekad je lokacija jedne ili više funkcionalnih grupa presudna za mehanizam aktivnosti prema Gram (+) ili Gram (-) bakterijama (Nazzaro i sar., 2013). *p*-Cimen je monoterpenska komponenta ulja za koju je pokazano da pojedinačno ispoljava antimikrobno dejstvo (Aligiannis i sar., 2001; Bagamboula i sar., 2004), ali i da pojačava antimikrobnu aktivnost ostalih komponenti u ulju (Ultee i sar., 2002). S druge strane neki pojedinačni terpeni iz ulja kao što su  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinene,  $\gamma$ -terpinen, (+)-sabinen i  $\alpha$ -terpinen su pokazali slabu ili nikakvu antimikrobnu aktivnost prema 25 vrsta bakterija (Dorman i sar., 2000) što ukazuje da neke komponente etarskog ulja ispoljavaju slabu antimikrobnu aktivnost kada se primene pojedinačno. Interesantan je podatak De Martino i saradnika (2009a, 2009b) o različitom ponašanju dva soja *B. cereus* nakon izlaganja istom etarskom ulju i njegovim pojedinačnim komponentama što ukazuje na to da osetljivost ciljnih mikroorganizama utiče na antimikrobno dejstvo etarskog ulja.

Móritz je sa saradnicima (2015) takođe testirao antimikrobnu aktivnost etarskog ulja *T. vulgare* i pokazao da su *cis*-hrizantenol, *trans*-hrizantenol i *trans*-hrizantenil acetat komponente iz etarskog ulja koje ispoljavaju najjače antibakterijsko dejstvo. Ove komponente su dominantne u etarskom ulju koje je predmet ove disertacije pa se može pretpostaviti da su i u ovom slučaju upravo one nosioci antimikrobne aktivnosti na testirane bakterije. Etarsko ulje je ispoljilo bolju aktivnost prema Gram (+) bakterijama što je u skladu da ranijim tvrdnjama da etarska ulja generalno ispoljavaju jače dejstvo na Gram (+) nego na Gram (-) bakterijske vrste (Quatara i sar., 1997; Lambert i sar., 2001; Pintore i sar., 2002; Harpaz i sar., 2003). I pored toga, kao rezultat ove teze ističe se vrlo snažna aktivnost etarskog ulja na Gram (-) *E. coli* i *E. cloacae*, što je značajno s obzirom na to da Gram (-) bakterije poseduju dodatni lipopolisaharidni omotač koji onemogućava difuziju hidrofobnih komponenti etarskog ulja. U omotaču Gram (-) bakterija nalaze se porini kroz koje prolaze i antimikrobni lekovi kao i mali hidrofilni molekuli, dok veliki, lipofilni molekuli teško

prolaze do unutrašnjosti ćelije, što povećava otpornost Gram (-) bakterija na lipofilne komponente etarskog ulja.

Ipak, pokazano je da male terpenoidne komponente kao i fenolne komponente mogu da dezintegrišu spoljni lipopolisaharidni omotač Gram (-) bakterija i negativno utiču na rast bakterijske ćelije (Burt, 2004). Ovo je jedan od razloga pokazane vrlo snažne antimikrobne aktivnosti ispitivanih metanolnih ekstrakata *T. vulgare* bogatih fenolnim komponentama. Svi metanolni ekstrakti su ispoljili snažno antibakterijsko dejstvo kako na Gram (+) tako i na Gram (-) bakterije. Dejstvo metanolnih ekstrakata na Gram (+) bakterije bilo je snažnije od streptomicina i ampicilina. *E. coli* i *E. cloacae* su ispoljile najveću senzitivnost prema delovanju metanolnih ekstrakata kao i etarskog ulja *T. vulgare*. Značajno je da su metanolni ekstrakti cveta, lista, stabla i korena pokazali različite minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne vrednosti što se može objasniti njihovim različitim hemijskim sastavom. Metanolni ekstrakt cveta ispoljio je najjaču antimikrobnu aktivnost što se može dovesti u vezu sa antimikrobnom aktivnosti izokvercetina u ovom ekstraktu. Antimikrobnu aktivnost izokvercetina potvrdili su Vijaya i Ananthan (1996) i u *in vivo* studiji koja je ukazala na to da ovaj flavonoid sprečava infekciju svinja izazvanu *Shigella* bakterijom. Ranija istraživanja ukazuju na to da su za antimikrobnu aktivnost ekstrakata odgovorne kako dominantne komponente tako i komponente koje su prisutne u manjoj koncentraciji u ekstraktu i da se ne može zanemariti njihov sinergistički ali i antagonistički efekat (Gallucci i sar., 2009; Hyldigaard i sar., 2012; Manzoor i sar., 2013). Alves je sa saradnicima (2013) ukazao na to da derivati cimetne kiseline ispoljavaju jaču antibakterijsku aktivnost prema Gram (+) i Gram (-) kokama u odnosu na ostale grupa bakterija. Flavonoidi i njihovi derivati imaju različite ciljne tačke preko kojih ispoljavaju svoju antimikrobnu aktivnost u zavisnosti od njihove hemijske strukture i rasporeda hidroksilnih i funkcionalnih grupa (Haraguchi i sar., 1998; Tsuchiya i sar., 2000). Sato i sardnici (1996, 1997) su ukazali na to da je 2' pozicija hidroksilne grupe važna za antimikrobnu aktivnost dok je Alcaraz sa saradnicima (2000) istakao važnost hidroksilne grupe na poziciji 5 za aktivnost prema meticilin rezistentnom *Staphylococcus aureus*. Prema *E. coli* ekstrakt *T. vulgare* je pokazao umerenu antimikrobnu aktivnost dok je *S. aureus* pokazao rezistentnost (Rauha i sar., 2000). Bączek i saradnici (2017) su ispitivali antibakterijsko dejstvo vodeno-etanolnih

ekstrakata *T. vulgare* i *T. balsamita*. Ekstrakt *T. vulgare* je ispoljio slabije antibakterijsko dejstvo u poređenju sa ekstraktom *T. balsamita*. U ovom radu je pokazano da su Gram (+) bakterije osetljivije na dejstvo vodeno-etanolnog ekstrakata *T. vulgare* u odnosu na Gram (-), osim u slučaju *K. pneumoniae* i *Y. enterocolitica*. Razliku u antibakterijskoj aktivnosti autori ove studije su objasnili razlikom u koncentraciji flavonoida koja je bila veća u vodeno-etanolnom ekstraktu *T. balsamita* u odnosu na *T. vulgare*.

U dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci o antifungalnoj aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata vrste *T. vulgare*. Osim što neke od vrsta mikromiceta mogu svojim mikotoksinima da dovedu do narušavanja zdravlja ljudi, toksičnih efekata na pojedine organe, pa čak i da indukuju mutagenezu ili ogenezu, mnogi sojevi mikromiceta imaju štetno dejstvo i u prehrambenoj industriji (Jay i sar., 2005; Bath i sar., 2010; Reddy i sar., 2010). Mogu se pojaviti na biljkama u samom polju, neke tokom žetve, a neke prilikom neprimerenog skladištenja, a zatim mogu dovesti do kontaminacije namirnica koje koriste kako životinje, tako i ljudi (Jay i sar., 2005). S toga je pronalaženje jedinjenja kojima je moguće inhibirati rast ovih mikromiceta ili ih čak potpuno eliminisati danas jedan od prioriteta velikog broja istraživanja.

Rezultati dobijeni tokom istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pokazali su da je etarsko ulje ispoljilo jaku antifungalnu aktivnost koja je bila na nivou referentnih antimikotika prema svim testiranim sojevima, osim prema mikromicetama *A. niger* i *T. viride*. Posebno snažna aktivnost etarskog ulja, oko sto puta jača nego aktivnost bifonazola i ketokonazola, se ispoljila prema biljnom patogenu *Penicillium funiculosum*.

I metanolni ekstrakti su ispoljili odličan fungistatski i fungicidni efekat. Značajnu aktivnost na sve ispitivane mikromicete pokazao je metanolni ekstrakt cveta čija aktivnost je bila snažnija nego aktivnost korišćenih antimikotika. Ovaj metanolni ekstrakt u poređenju sa ostalim sadrži značajnu količinu izokvercetina, čime se može objasniti njegova antifungalna aktivnost. Yung i saradnici (2015) su dokazali snažnu antifungalnu aktivnost izokvercetina prema pet patogenih mikromiceta. U njihovom radu u *in vivo* testu pokazano je da izokvercetin uzrokuje premeštanja molekula unutar fosfolipidnog dvosloja i da dovodi do poremećaja u propustljivosti membrane ćelija gljiva. Ove promene uzrokuju skupljanje

ćelije izazvano povećanjem permeabilnosti membrane, gubitkom jona i padom osmotskog potencijala te na kraju dovode do smrti ćelije (Yung i sar., 2015). Autori prethodne studije su predložili primenu izokvercentina u kliničkim studijama kao stabilnog antifungalnog agensa koji pritome ne izaziva hemolizu.

Na osnovu rezultata ove disertacije koji opisuju uglavnom visoku antimikrobnu, a naročito antifungalnu aktivnost, etarsko ulje i metanolni ekstrakti *T. vulgare* bi se mogli koristiti u prevenciji, ali i lečenju određenih bolesti izazvanih vrstama prema kojima je pokazana visoka aktivnost, ali i kao agensi u konzerviranju i očuvanju kvaliteta namirnica u prehrambenoj industriji.

### **5.5. Citotoksična aktivnost etarskog ulja i metanolnih ekstrakata**

Zbog velikog broja obolelih i veoma teške kliničke slike koju većina malignih oboljenja ima, onkologija je danas svuda u svetu jedna od grana medicine u kojoj se najčešće traga za alternativama klasičnom lečenju. Terapija malignih oboljenja, koja nažalost često ne pruža adekvatan tretman koji bi doveo do izlečenja, zasniva se pored hirurgije i zračenja (radioterapije), na korišćenju različitih hemijskih jedinjenja sa citotoksičnim efektom (hemoterapija). Osnovni problem kod primene hemoterapije jeste što većina korišćenih medikamenata deluje neselektivno te se toksičan efekat ispoljava i na zdrave ćelije čime se izaziva čitav niz veoma negativnih kontraindikacija, kao što su supresija imunog sistema, alergijske reakcije, promene u srčanom radu, disbalans elektrolita, povraćanje i slično. Stoga postoji stalna potreba za pronalaženjem novih jedinjenja koja će biti visoko efikasna prema oženim ćelijama, ali nisko toksična za ostatak organizma.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan je citotoksični potencijal etarskog ulja i metanolnih ekstrakata cveta, lista, stabla i korena *T. vulgare* na maligne ćelijske linije adenokarcinoma cerviksa (HeLa). Radi utvrđivanja nivoa selektivnog efekta, ispitivana je i aktivnost gorepomenutog etarskog ulja i ekstrakata na zdrave humane ćelijske linije fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5). Posmatrane su i promene u morfologiji tretiranih ćelija koje

vode ka programiranoj ćelijskoj smrti nakon izlaganja ekstraktima, a dobijena citotoksična aktivnost je upoređena sa često korišćenim citostatikom, cisplatinom.

Ranija istraživanja ukazuju na to da brojna etarska ulja koja čine kompleksne smeše jedinjenja mogu posedovati supresivnu aktivnost prema ćelijskim linijama a mozga, debelog creva, jetre, pluća, dojke, leukemije i drugih. Tako etarsko ulje matičnjaka (*Melissa officinalis* L.) pokazuje citotoksičnu aktivnost prema mnogim tumorskim ćelijskim linijama (De Sousa i sar., 2004), dok etarsko ulje australijskog čajevca (*Melaleuca alternifolia*) izaziva apoptozu ćelija melanoma pri čemu je antiogena aktivnost pripisana monoterpenskom alkoholu terpinen-4-olu (Calcabrini i sar., 2004). Etarska ulja ispoljavaju antiogeno dejstvo zahvaljujući antioksidativnim, antimutagenim i/ili antiproliferativnim osobinama svojih konstituenata (Bhalla i sar., 2013). Većina ispitivanih etarskih ulja sa citotoksičnim efektom delovala su na slobodne radikalske grupe, koje osim što izazivaju mnoga degenerativna stanja, mogu da deluju i na jačanje imunih funkcija organizma ili na modulaciju rezistencije prema citostaticima. Sa druge strane i pojedini izolovani konstituenti etarskih ulja mogu pokazivati antiproliferativnu i citotoksičnu aktivnost prema tumorskim ćelijama. Citotoksičnost etarskih ulja uglavnom uključuje poremećaj u strukturi biomembrana koji uključuje prooksidativnu aktivnost etarskih ulja. Seskviterpenski laktoni iz etarskog ulja kamilice (*Matricaria chamomilla*) indukuju apoptozu kod ćelija a mozga (Cavalieri i sar., 2004). Slično, geraniol, *d*-limonen, 1,8 cineol,  $\alpha$ -terpinen izolovani iz etarskih ulja različitih biljaka i primenjeni kao pojedinačna jedinjenja pokazuju citotoksičnu aktivnost *in vitro* (Carnesecchi i sar., 2004; Moteki i sar., 2002; Fresco i sar., 2006). Etarsko ulje *T. vulgare* ispoljilo je citotoksičnu aktivnost pri većim primenjenim koncentracijama (IC<sub>50</sub>=290mg/mL). Pritom je etarsko ulje pokazalo i selektivnost jer je citotoksičnost bila nešto jača prema HeLa nego prema kontrolnim MRC-5 ćelijskim linijama. Čak je etarsko ulje pri najnižoj primenjenoj koncentraciji stimulisalo proliferaciju zdravih MRC-5 ćelija. U ranijim studijama je monoterpenskom alkoholu terpinen-4-olu, koji je prisutan i u analiziranom etarskom ulju *T. vulgare* sa 2,92% udela, pripisana antiogena aktivnost etarskog ulja australijskog čajevca (Calcabrini i sar., 2004). Autori ove studije su pokazali da terpinen-4-ol deluje na reorganizaciju membranskih lipida plazma-membrane. Dodatno, u etarskom ulju *T. vulgare* detektovano je prisustvo i 1,8-cineola

(3,88%) za koga je pokazano da u tretmanu humanih HL-60 ćelijskih linija leukemije uzrokuje morfološke promene i fragmentaciju DNK što ukazuje na indukciju apoptoze (Moteki i sar., 2002; Yoo i sar., 2005).

U dostupnoj literaturi je pokazano da etarsko ulje nekih vrsta roda *Tanacetum* poseduje citotoksičnu aktivnost. Posebno se izdvaja aktivnost seskviterpenskg laktona partenolida iz *T. parthenium* koji ispoljava značajnu citotoksičnost prema različitim tipovima ćelija a među kojima su ćelije a pluća (A549), a debelog creva (HT-29), a mozga (TE671) i melanoma (Parada-Turska i sar., 2007; Ghantous i sar., 2010; Lesiak i sar., 2010; Mathema i sar., 2012). Ipak jedno od najznačajnijih karakteristika ovog jedinjenja jeste da pokazuje selektivnost u odnosu na zdrave ćelije (Patel i sar., 2000; Mathema i sar., 2012) te su intenzivna klinička ispitivanja partenolida kao mogućeg citostatika u toku. U etarskom ulju *T. vulgare* čiji je citotoksični efekat u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan, partenolid nije detektovan. Seskviterpenski ugljovodonici kojima prirada ovo jedinjenje činili su svega 0,03%, te slabo citotoksično dejstvo ovog ulja ne može da se pripíše ovom jedinjenju već su najverovatnije nosioci citotoksične aktivnosti monoterpenoidna jedinjenja među kojima su i jedinjenja sa dokazanim antiogenim delovanjem.

S druge strane, metanolni ekstrakti cveta, lista, stabljike i korena *T. vulgare* ispoljili su nešto bolji citotoksičan efekat koji je bio dozno i vremenski zavistan. Od svih testiranih ekstrakata metanolni ekstrakti cveta i lista su pokazali najveću citotoksičnost, koja je bila u mikrogramskom opsegu koncentracija (do 100 µg). Najjaču antiproliferativnu aktivnost ispoljio je metanolni ekstrakt lista koji je pokazao i blagu selektivnost, delujući jače na HeLa ćelije. Takođe, oba ova ekstrakta izazvala su gubitak atezije kod HeLa ćelija što ukazuje na indukovanu ćelijsku smrt. S druge strane ova promena nije zabeležena kod MRC-5 ćelija nakon delovanja ekstrakata. Selektivna antiproliferativna aktivnost mogla bi da se objasni delovanjem različitih konstituenata iz ekstrakata na specifične molekule onkogenih signalnih puteva koji učestvuju u regulaciji ćelijskog rasteanja, proliferacije i apoptoze. Selektivnost u citostatičkoj aktivnosti prema malignim ćelijskim linijama u odnosu na zdrave ukazuje na to da ekstrakt lista poseduje citotoksični potencijal.

Analiza hemijskog sastava primenjenih metanolnih ekstrakata pokazala je da je relativna zastupljenost 3,5-*O*-dikafeoilhininske kiseline najveća upravo u najefikasnijim metanolnim ekstraktima, izolovanim iz cveta i lista. Miccadei i saradnici (2008) su ukazali na antiogeno dejstvo hidroksicinamičnih kiselina koje dovode do redukcije ćelijske vijabilnosti i indukcije apoptoze. Ovi autori su antiogenu aktivnost ovih kiselina doveli u vezu sa njihovom antioksidativnom sposobnosti delujući pri tom i na povećanje ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima. Puangpraphant i saradnici (2011) su pokazali da dikefeoilhininska kiselina (DCQA) inhibira proliferaciju CRL-2577 i HT-29 humanih ćelijskih linija karcinoma debelog creva. Amigo-Benavent i saradnici (2017) su ukazali na to da derivati kefeoilhininske i dikafeoilhininske kiseline redukuju oksidativni stres i produkciju ROS koje su u vezi sa inicijacijom a i njegovom daljom progresijom.

U metanolnim ekstraktima lista i cveta *T. vulgare* detektovani su i glukozidi luteolina. U literaturi postoje brojni podaci o antiogenom dejstvu luteolina. U radu Horinaka i saradnika (2005) pokazano je da luteolin izaziva apoptozu HeLa ćelijskih linija dok je Xie sa saradnicima (2012) ukazao na to da luteolin inhibira Aurora B serin/treonin kinazu koja reguliše mitozu u HeLa ćelijama. Antiogenu aktivnost luteolin je ispoljio i preko zastoja ćelijskog ciklusa u S i G2/M fazama MDA-MB-231 ćelija adenocarcinoma dojke i indukcijom apoptoze ovih ćelija (Lee i sar., 2012).

Metanolni ekstrakt cveta ispitan u ovoj disertaciji je jedini sadržavao izokvercetin, dok su jedino u metanolnom ekstraktu lista detektovani kvercetagetin-3,6-dimetiletar i eupalitin. Izokvercetin je glikozid kvercetina za koga je pokazano da je jedan od najjačih antiogenih agenasa (Waterhouse, 2002). Prema literaturnim podacima kvercetin je ispoljio antiogenu aktivnost prema različitim tipovima malignih ćelijskih linija uključujući HeLa ćelije adenocarcinoma cerviksa, MDA-MB-453 ćelije karcinoma dojke, Vo Lo ćelije karcinoma debelog creva, A549 ćelije karcinoma pluća i K562 ćelija mijeloidne leukemije (Murakami i sar., 2008; Chien i sar., 2009; Vidya i sar., 2010; Dajas, 2012). Jaku citotoksičnu aktivnost kvercetin je ispoljio prema HeLa ćelijskim linijama uzrokujući zastoj HeLa ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa kao i indukciju apoptoze aktivacijom unutrašnjeg mitohondrijalnog puta (Vidya i sar., 2010).

Kvercetagetin deluje kao inhibitor protoonkogenih kinaza (Kang i sar., 2011), dok je eupalitin ispoljio značajnu citotoksičnost prema ćelijama a debelog creva i karcinom prostate indukujući apoptozu (Ghalib i sar., 2013). Slično rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji i Negrín i saradnici (2015) su ukazali na antiproliferativnu aktivnost etanolnih ekstrakata *T. oshanahanii* i *T. ptarmiciflorum* prema ćelijskim linijama melanoma i leukemije. Ova studija je pokazala da je eudezmanolid tanapsin iz ekstrakta *T. oshanahanii* nosilac citotoksične aktivnosti kod ove vrste pošto je ekstrakt *T. ptarmiciflorum* koji nije sadržavao tanapsin ispoljio slabu citotoksičnost.

Za razliku od metanolnih ekstrakata *T. vulgare* analiziranih u ovoj disertaciji gde su dominantna jedinjenja pripadala grupi fenolnih kiselina, Roselli i saradnici (2012) su publikovali studiju o citotoksičnoj aktivnosti dihlormetanskog ekstrakta cveta *T. vulgare*. Iz ovog ekstrakta izolovano je pet jedinjenja, seskviterpenskih laktona kod kojih je potvrđena citotoksična aktivnost *in vitro* prema A549 ćelijskim linijama karcinoma pluća kao i prema zdravim ćelijama plućnih fibroblasta (V79379A). S druge strane, vodeno-etanolni ekstrakt *T. vulgare* je ispoljio dozno i vremenski zavisnu citotoksičnost prema MCF7 ćelijskim linijama karcinoma dojke (Gospodinova i sar., 2014). U ovom radu IC<sub>50</sub> vrednost je iznosila 286,8 µg/mL a tretman malignih ćelija ovim ekstraktom izazvao je morfološke promene na ćelijama. Wegeira i saradnici (2012) su u pilot studiji ispitivali citotoksični efekat lekovitih biljaka iz familije Asteraceae na J-45.01 humane ćelijske linije leukemije i utvrdili da etanolni ekstrakt *T. vulgare* ispoljava antiogenu aktivnost indukujući apoptozu. U ovom radu IC<sub>50</sub> vrednosti su iznosile 360 µg/mL (herba), 200µg/mL (cvet) i 300µg/mL (koren). IC<sub>50</sub> vrednosti dobijene kao rezultat ove disertacije ukazuju na jaču antiogenu aktivnost metanolnih ekstrakata cveta, lista, stabljike i korena u poređenju sa rezultatima Wegeira i saradnika (2012).

Kao kontrola citotoksičnog delovanja u eksperimentima opisanim ovom doktorskom disertacijom korišćen je široko primenjivani cisplatin. Ovaj citostatik koji u svom sastavu sadrži platinu i koji svoju aktivnost ispoljava vezujući se i blokirajući duplikaciju DNK molekula, odlikuje se niskom selektivnošću, te pored efekta na tretirane onkoćelije dovodi i do pojave niza veoma ozbiljnih kontraindikacija



([www.drugs.com/monograph/cisplatin.html](http://www.drugs.com/monograph/cisplatin.html)). Međutim i etarsko ulje *T. vulgare* kao i svi ispitivani metanolni ekstrakti ispoljili su znatno slabiju antiproliferativnu aktivnost na ciljne ćelije u odnosu na ovaj citostatik, što njihovu aplikaciju dovodi u pitanje. Ipak, prisustvo derivata kvercetina u ekstraktima sa najjačim dobijenim antiproliferativnim efektom i dokazanoj selektivnoj indukciji apoptoze ukazuje na mogućnost direktne poveznosti ove grupe jedinjenja i specifičnog citostatičkog delovanja na testirane onkogene ćelije. Kontrolisana proizvodnja ovih aktivnih citotoksičnih jedinjenja u *in vitro* kulturama izdanaka *T. vulgare* putem mikropropagacije mogla bi da predstavlja perspektivni pristup koji je potrebno detaljno istražiti.

### **5.6. Efekat etarskog ulja *T. vulgare* na gusenice gubara (*Lymantria dispar* L.)**

Gusenice gubara (*Lymantria dispar* L.) predstavljaju jedne od glavnih štetočina listopadnih šuma severne hemisfere (Elkinton i Liebhold, 1990). Pored toga, ove gusenice predstavljaju opasnost i za urbane ekosisteme, parkove, drvorede i voćnjake. Gusenice gubara su polifagne i hrane se lišćem i pupoljcima više od 300 vrsta drveća izazivajući golobrst. Hrane se lišćem svih drvenstih vrsta uključujući lišćare, četinare i voćke kao i žbunaste vrste (Mihajlović, 2008). Na Balkanskom poluostrvu ovaj insekt se sreće na području do 1600 m nadmorske visine i predstavlja najveću štetočinu šuma u Srbiji (Janković, 1954; Mihajlović, 2008). Povremeno populacije gubara dostižu veliku brojnost odnosno dolazi do gradacije koja traje tri do šest godina, izazivajući golobrste šuma, voćnjaka ali i urbanog zelenila. Usled golobrsta dolazi do fiziološkog slabljenja stabala koja postaju osetljiva na druge štetočine i bolesti što može uzrokovati njihovo sušenje. Najveće štete prave šumama cera jer za razvoj gusenica najviše odgovaraju čiste hrastove šume (Milanović, 2006).

Sve prethodno upućuje na zaključak da se suzbijanju gubara mora posvetiti posebna pažnja. Preventivne mere suzbijanja uključuju stalno praćenje populacija gubara različitim metodama (Cameron, 1979; Tabaković–Tošić, 2004; Mihajlović, 2008). Represivne mere uključuju mehaničke, hemijske i biološke mere.

U cilju kontrole ove štetočine najčešće se koriste konvencionalni pesticidi, koji se često upotrebljavaju preobimno i nepravilno što uzrokuje dodatnu štetu u ekosistemima. U skladu sa savremenim pristupima integrisane kontrole štetočina (IPM, eng. *Integrated Pest Management*) koja kombinuje biološke i hemijske mere kontrole određenih štetočina, danas se u cilju smanjivanja brojnosti populacija gusenica gubara primenjuju i biološke mere u formi *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) insekticida. Ovaj kristalni protein izolovan je iz bakterije *Bacillus thuringiensis* (Bt), a svoje insekticidalno dejstvo ostvaruje vezivanjem za aktivno mesto receptora epitelijalnih ćelija digestivnog sistema insekta, čime narušava varenje i apsorpciju hrane koja dovodi do neefikasne ishrane i smrti (Kumar i sar. 1996). Otkriveno je da antibiotik zvitermicin A pospešuje toksično delovanje *Bt* insekticida, a pri tome ne ispoljava toksični efekat na gusenice gubara (Broderick i sar., 2000).

Iako su gusenice gubara poznate kao polifagne i veoma “proždrljive” pokazano je da u listopadnim šumama ne hrane lišćem jasena (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh). Marković i sar (1996a) su pretpostavili da larve izbegavaju ovu vrstu jer bivaju odbijene dejstvom isparljivih jedinjenja listova. U daljim istraživanjima Marković i saradnici (1996b) su izdvojili nekoliko isparljivih jedinjenja iz listova jasena i analizirali efekte kompleksne smeše ovih jedinjenja, ali i pojedinačnih komponenti na gusenice gubara. Autori su ukazali na repelentno delovanje linaloola, metil salicilata i farnezena, dok dominantno jedinjenje *trans*-ocimen nije ispoljilo repelentnu aktivnost.

U poslednje vreme rukovodeći se sve većim zahtevima za očuvanjem prirodnih ekosistema i životne sredine dominantne su studije u čijem fokusu su analize različitih biljnih komponenti, prevashodno produkata sekundarnog metabolizma, koja mogu da se koriste kao biološke mere suzbijanja štetočina. Unapređuju se varijeteti *Bt* preparata (Khodyrev i sar., 2010) i intenzivno se ispituju jedinjenja koja se klasifikuju kao sekundarni metaboliti a koji mogu imati repelentno ili insekticidno dejstvo, uključujući i etarska ulja kao kompleksne smeše jedinjenja sa različitim biološkim aktivnostima. Etarska ulja su posebno značajna jer ispoljavaju nisku toksičnost i u preparatima su uglavnom zastupljena u niskoj koncentraciji pa ne izazivaju neželjene posledice na druge organizme u ekosistemu.

Dosadašnja ispitivanja efekta etarskih ulja na larve gusenica pokazala su da su ulja vrsta *Athamanta haynaldii* i *Myristica fragrans* ispoljila antifidnu aktivnost, utičući na smanjivanje unosa i efikasnosti ishrane gusenica, dok je larvicidalna aktivnost ovih ulja procenjena pomoću testa rezidualne toksičnosti i mortaliteta larvi, bila slaba (Kostić i sar., 2013). Isti testovi korišćeni su i za analizu toksičnosti etarskog ulja bosiljka (*Ocimum basilicum*) i linaloola kao njegove dominantne komponente na gusenice gubara (Kostić i sar., 2008). I ulje i linalool, ispoljili su značajnu antifidnu aktivnost pri čemu je toksičnost bila na niskom do umerenom nivou.

U okviru ove disertacije ispitivan je efekat etarskog ulja *T. vulgare* na gusenice gubara u laboratorijskim uslovima. Ispitivan je direktan toksični potencijal etarskog ulja praćenjem mortaliteta gusenica i presvlačenja larvi iz drugog u treći stupanj kao i indirektan toksični potencijal izazvan digestivnom toksičnošću koja se ogleda i u promenama performansi rasteња i razvića larvi. Slično već opisanim studijama, ni etarsko ulje *T. vulgare* nije ispoljilo akutnu toksičnost na gusenice gubara. Samo u slučaju najveće primenjene koncentracije (1,0%) etarsko ulje je preko rezidualne kontaktne toksičnosti izazvalo mortalitet 8% gusenica.

Analiza direktne toksičnosti posmatrana kroz uticaj na razviće larvi, koje je praćeno kroz presvlaćenje larvi iz drugog u treći stupanj, ukazala je na to da je etarsko ulje *T. vulgare* izazvalo odlaganje presvlaćenje i značajno smanjenje procenta presvućenih gusenica. Nakon delovanja etarskog ulja gusenice gubara su duže ostajale u istom stadijumu razvića, odnosno etarsko ulje je usporilo njihovo normalno razviće. Poznato je da je larvama insekata za prelazak iz jednog u drugi stupanj razvića neophodno da dostignu određenu masu i da prestanu da se hrane da bi usledila metamorfoza (Nijhout, 1994). Digestija hrane u kojoj se nalazilo etarsko ulje *T. vulgare* smanjila je efikasnost ishrane i dovela do smanjenog prirasta telesne mase, a samim tim i na odlaganje trenutka kada se dostiže kritična masa koja indukuje proces presvlaćenja. Na ovaj način značajno je smanjen procenat presvućenih gusenica u analiziranoj grupi. Toksičnost hranom unetog etarskog ulja se ispoljila već nakon 24 h od ingestije. Mortalitet nije zabeležen jedino kod gusenica koje su unosile hranu u kojoj je bilo etarsko ulje u najmanjoj ispitivanoj koncentraciji dok

je kod grupe gusenica koje su hranom unele i etarsko ulje u koncentraciji od 1,0% zabeleženi mortalitet bio čak 72%. U odnosu na kontrolnu grupu gusenica hranjenih veštačkom hranom bez dodatog etarskog ulja uočava se da digestija hrane sa dodatkom etarskog ulja u svim ispitivanim koncentracijama znatno smanjuje ili u potpunosti zaustavlja presvlačenje i na taj način usporava razviće gubara. Usporavanje razvića sa jedne strane smanjuje verovatnoću preživljavanja larvi jer ostaju duže izložene predatorima, a sa druge strane odlaže pojavu adulta i reprodukciju (Roff, 2000). Na ovaj način etarsko ulje *T. vulgare* ostvaruje negativan efekat na preživljavanje gubara. Etarsko ulje *T. vulgare* je produžilo razviće larvi manjeg brašnara *Alphitobius diaperinus* (Szolyga i sar., 2014). Ponekad smeša etarskog ulja ima jače delovanje nego njena dominantna komponenta i obrnuto (Abbasay i sar., 2009; Szczepanik i sar., 2012). Studija Szolyga i saradnika (2014) je ukazala i na to da nije bilo razlike u aktivnosti prema larvama *A. diaperinus* kompleksne smeše etarskog ulja u odnosu na  $\beta$ -tujon, dominantnu komponentu ulja. Digestivnu toksičnost prema gusenicama gubara ispoljavaju i etarska ulja *Rosmarinus officinalis* Linn. i *Thimus herba-barona* Loisel (Moretti i sar., 2002).

Pored toga što je uticala na preživljavanje i presvlačenje gusenica gubara, ingestija etarskog ulja *T. vulgare* uticala je i na druge parametre rastenja i razvića gubara posmatrane kod gusenica četvrtog stupnja razvića. Etarsko ulje je smanjilo dnevni prirast mase gusenica četvrtog stupnja. Najmanja ispitivana koncentracija etarskog ulja uzrokovala je smanjenje relativnog dnevnog prirasta mase za 37% dok je etarsko ulje u koncentraciji od 1,0% smanjilo dnevni prirast mase za 80% u odnosu na kontrolu. Povećanje koncentracije etarskog ulja u veštačkoj hrani kojom su gusenice hranjene dovelo je do smanjenja brzine konzumacije hrane te su gusenice gubara sa povećanjem koncentracije etarskog ulja u hrani unosile sve manje hrane po miligramu sopstvene mase. Tako su kontrolne gusenice unosile 50% više hrane po miligramu sopstvene mase od gusenica čija hrana je sadržavala etarsko ulje u koncentraciji od 1,0%. Ova koncentracija etarskog ulja (1,0%) smanjila je efikasnost asimilacije unete hrane koja nije značajno smanjena ingestijom etarskog ulja manjih koncentracija (0,1 i 0,5%). Negativan efekat digestije etarskog ulja ogledao se i u značajnom smanjenju konverzije unete hrane u biomasu gusenica koja je unosom etarskog ulja u koncentraciji od 0,5 i 1,0% smanjena za 60% u odnosu na kontrolu. Iako je etarsko

ulje uticalo i na smanjenje konverzije svarene hrane u biomasu gusenica, to smanjenje se nije pokazalo kao statistički značajno pa se može zaključiti da su time smanjen negativni efekat ingestije etarskog ulja i delom kompenzovan smanjeni unos hrane izazvan prisustvom etarskog ulja.

Ranije je ukazano na to da neke komponente etarskih ulja mogu oštetiti ćelije epitela srednjeg creva i uticati na rad digestivnih enzima što se dovodi do smanjanja efikasnosti asimilacije hrane i utiče na normalano rastenje i razviće insekata (Koul *et al.*, 2004; Zibae i Bandani, 2010; Shannag i sar., 2015). Neke studije su pokazale da etarska ulja bogata tujonskim komponentama utiču na intestinalnu mikrofloru zahvaljujući svojoj antimikrobnoj aktivnosti te tako remete digestivne procese i apsorpciju hrane (Brenes i Roura, 2010; Srivastava *et al.*, 2012). Etarsko ulje *T. vulgare* nije ispoljilo samo kratkoročni efekat koji se ogleda u smanjenju relativne brzine konzumacije hrane već je redukovalo konverziju unete hrane u biomasu. Za rastenje i razvoj insekata neophodan je adekvatan nivo unosa nutrijenata i konverzije unete hrane u energiju i biomasu (Reese, 1978). Efikasnost konverzije unete i svarene hrane u biomasu je merilo sposobnosti insekata da iskoristi hranu unetu ingestijom za sopstveni rast i razvoj (Naseri i sar., 2009). Smatra se da etarsko ulje ne ispoljava hroničnu toksičnost ukoliko ne uzrokuje promene u parametrima efikasnosti konverzije hrane u biomasu (Koul i sar., 2008). Smanjenje unosa hrane kao i smanjenje efikasnosti konverzije hrane u biomasu produžavaju razviće larvi verovatno i iz razloga što je hormonalni mehanizam koji reguliše razviće većine životinja delom regulisan i unosom hrane (Bernard i Lagadic, 1993). Pored toga, smanjenje parametara konverzije unete i svarene hrane u biomasu gusenica može se objasniti i time da insekti veliki deo energije dobijene hranom troše na indukciju enzima koji učestvuju u detoksifikaciji nekih od komponenata etarskog ulja (Khosravi i Sendi, 2013).

Ovi rezultati ukazuju na to da je etarsko ulje ispoljilo negativan efekat na rastenje i razviće kako mlađih tako i starijih larvi gubara što se razlikuje od podataka Szolyga i saradnika (2014) koji su ukazali na to da etarsko ulje *T. vulgare* ima jače dejstvo na mlađe nego na starije larve. Etarsko ulje *T. vulgare* ispoljilo je repelentnu aktivnost prema zlatici (*Leptinotarsa decemlineata* Say) u studiji u kojoj je *T. vulgare* zasađen između biljaka

krompira (*Solanum tuberosum* L.) (Panasiuk, 1984). Nešto kasnije je Hough-Goldstein (1990) pokazao da vodeni ekstrakt lista *T. vulgare* ispoljava jaku antifidnu aktivnost prema zlatici kao i da je uzrokovao značajan mortalitet larvi koje su hranjene listovima isprskanim ovim ekstraktom. Larocque i saradnici (1999) su pokazali da etarsko ulje *T. vulgare* dodato u hranu povećava smrtnost larvi polifagne štetočine *Choristoneura rosaceana* Harris, koja pravi velike štete na stablima jabuke. Ova studija je ukazala i na to da hronična izloženost etarskom ulju preko hrane ne deluje na parametre rasta i razvića kod mužjaka ali dovodi do smanjenja biomase pupe kod ženki i do odlaganja poleganja jaja. Gabel i Thiery (1994) su predložili to da isparljiva jedinjenja iz etarskog ulja *T. vulgare* utiču na fiziološke i bihevioralne mehanizme koji su povezani sa polaganjem jaja.

U novije vreme upotreba etarskih ulja kao insekticida niskog rizika je u sve većem porastu naročito sa rastom popularnosti organskog uzgoja i ekološke svesnosti korisnika. Uz retke izuzetke etarska ulja su nisko toksična za sisare i kratko opstaju u ekosistemu što još više favorizuje upotrebu ovih produkata niskog stepena rizika a visoke koristi.

### **5.7. Efekat etarskog ulja *T. vulgare* na indukciju odbrambenih mehanizama kod krompira gajenog *in vitro***

Jedan od najvećih izazova poljoprivredne proizvodnje s početka XXI veka je bilo obezbeđivanje dovoljno hrane za rastuću ljudsku populaciju (Hertel, 2015). Unapređivanja u proizvodnji hrane započeta samom domestifikacijom biljnih vrsta uglavnom su se zasnivala na unapređivanju karakteristika koje su u direktnoj vezi sa povećanjem prinosa. Međutim, usled ovako ciljane selekcije neretko je dolazilo do gubitka otpornosti gajenih kultura prema štetočinama i bolestima izazvanim različitim patogenima (Wink, 1988; Rosenthal i Dirzo, 1997). Rešenje problema osetljivosti prema štetočinama uglavnom je podrazumevalo korišćenje sintetičkih pesticida i to najčešće u velikim količinama i potpuno neselektivno. To je rezultovalo ozbiljnim problemima sa kojima se u savremeno doba suočavaju proizvođači hrane širom sveta, a koji podrazumevaju razvijanje otpornosti štetočina na aktivne komponente pesticida, štetan neselektivan efekat na vrste koje nisu štetočine ali i zagađenje prirode i potencijalne štetne efekte po zdravlje ljudi i domaćih

životinja (Handford i sar., 2015). Stoga je poslednjih decenija potraga za alternativnim pristupom u rešavanju problema štetočina u poljoprivredi okrenuta ka istraživanju prirodnih jedinjenja kojima bi se delovalo direktno na štetočine ili pak povećala otpornost poljoprivrednih useva.

Sekundarni metaboliti biljaka prepoznati su kao potencijalne alternative pesticidima i predstavljeni kao nova generacija zelenih insekticida sa velikim potencijalom za komercijalno korišćenje u poljoprivredi (Adeyemi, 2010; Dayan i sar., 2009). Međutim, osim potencijala da direktno deluju na ciljane insekte, o čemu je prethodno bilo reči, pokazano je da etarska ulja mogu i da indukuju "priming" odgovore kod biljaka koje se nalaze u okolini suseda koji emituju ove smeše isparljivih jedinjenja. Do sada je publikovan veliki broj studija koje se bave efektom etarskih ulja na povećanje "priming" indukovane otpornosti pojedinih biljnih vrsta ali pre svega na patogene bakterije i gljive. U najvećem broju slučajeva analizirana je ekspresija gena uključenih u sistemsku izazvanu rezistenciju (SAR; eng. *Systemic Acquired Resistance*), koja podrazumeva niz odbrambenih reakcija iniciranih akumulacijom salicilne kiseline (SA) na mestu infekcije patogenima. Pokazano je da tokom "priming" dolazi do promene u ekspresiji gena povezanih sa patogenezom (PR) (Jung i sar., 2009; Dempsey i Klessig, 2012).

Među prvim istraživanjima koja su dokazala indukovanu odbranu protiv insekata štetočina i "priming" nakon delovanja VOC publikovana je studija Arimure i saradnika (2000). U svojim eksperimentima ova grupa je pokazala da nakon napada paučinara *Tetranychus urticae*, listovi lima pasulja (*Phaseolus lunatus*) emituju smešu isparljivih jedinjenja koja privlači predatore ovih vaši, vrstu *Phytoseiulus persimili* ali istovremeno indukuju sličnu reakciju i u susednim neinficiranim biljkama kao i aktivnost gena koji kodiraju proteine uključene u različite mehanizme odbrane. Zanimljivo, odgovor indukovani smešom isparljivih jedinjenja nakon napada herbivora (HIPVs) izostao je kada su listovi bili izloženi isparljivim jedinjenjima mehanički povređenih listova.

Etarsko ulje *T.vulgare* prisutno u atmosferi suda u kome su rasle biljke krompira *in vitro*, izazvao je veoma intenzivnu indukciju dva analizirana PR gena, PR-2 i PR-5. Prve promene u ekspresiji uočene su nakon 8 sati od izlaganja. Ovo se smatra veoma brzim

odgovorom, s obzirom da verujemo da je za ovo vreme bilo potrebno da se dostigne kritična koncentracija aktivnih isparljivih jedinjenja u atmosferi, da biljka reaguje na “priming” stimulus i signalnom kaskadom indukuje ekspresiju ovih gena. Iako se o mehanizmu percepcije, signalnim molekulima i faktorima koji regulišu transkripciju ovih gena malo zna, kod većine publikovanih studija vremenski okvir za koji se akumulira količina ovih transkripata je slična. Jedna od najsveobuhvatnijih studija poslednjih godina bavio se proučavanjem potencijala korišćenja etarskog ulja vrste *Gaultheria procumbens* u cilju biokontrole na model biljci *Arabidopsis thaliana* (Vergnes i sar., 2014). Nakon aplikacije etarskog ulja praćena je ekspresija čak 96 gena koji učestvuju u odbrani tokom 1, 6 i 24 h. Zabeležena je intenzivna indukcija odbrambenih markera uključenih u regulatorne puteve salicilne kiseline, kao i akumulacija same SA. Među najintenzivnije pogođenim genima bili su PR-1 i PR-5. I dok se ekspresija PR-5 gena udvostručila već 1 h nakon aplikacije ovog etarskog ulja prskanjem po listovima, kasnije se aktivnost ovog gena vratila na nivo kao kod kontrolnih netretiranih biljaka. Međutim drugi analizirani gen bio je PR-1 kod koga je najviši stepen indukcije zabeležen 6 sati nakon tretmana, sa blizu 60 puta većom ekspresijom koja je nastavila da se intenzivira. Nakon 24 h u tretiranim biljkama je bilo 120 puta više transkripata ovog gena nego u kontroli. Ovako intenzivan odgovor mogao bi da se objasni činjenicom da je osnovni sastojak ovog ulja sa preko 96% zastupljenosti metil-salicilat (MeSA), koji u biljnim tkivima može biti metabolisan u salicilnu kiselinu koja direktno indukuje aktivnost ovih gena. Dodatnu potvrdu prajminga ovi autori su prikazali merenjem stepena rezistentnosti biljaka *A. thaliana* nakon delovanja etarskog ulja prema patogenoj gljivi *Colletotrichum higginsianum*. Rezultati su pokazali da je razviće patogena u biljkama *A. thaliana* koje su bile u stanju indukovane odbrane bilo redukovano za 60%, dok se efikasnost etarskog ulja *G. procumbens* mogla porediti sa komercijalom preparatom BION®, čija je aktivna komponenta BTH (benzo(1,2,3)-tiadiazol-7 karbotiolna kiselina) funkcionalni analog salicilne kiseline.

U slučaju PR-2 gena indukcija ekspresije je bila vrlo intenzivna i nakon 12 h delovanje etarskog ulja *T. vulgare*, ekspresija ovog gena je dostigla maksimum koji je bio 50 puta veći u odnosu na kontrolu. Promena u ekspresiji PR-5 gena izazvana isparljivim jedinjenjima etarskog ulja *T. vulgare* je bila znatno manje intenzivna. Ali za razliku od etarskog ulja *G.*



*procumbens* sa dominantnim učešćem samo jednog jedinjenja (MeSA) ulje *T. vulgare* je mnogo složenija smeša u kojoj je prema GC-MS analizi dominantno jedinjenje *trans*-hrizantenil acetat bilo zastupljeno sa manje od 50%. Ipak, na osnovu preliminarne PTR-MS analize i merenja zastupljenosti pojedinačnih jedinjenja u atmosferi teglica u kojima je bio krompir, tokom prva dva sata tokom kojih verujemo da dolazi do indukcije “priming” reakcija, *trans*-hrizantenil acetat je bio čak 65 puta manje zastupljen od monoterpenskih ugljovodonika  $\alpha$ -pinena i *p*-cimena. Pored ovih jedinjenja i artemizia-keton, *cis*-tujon, *trans*-tujon i kamfor su bili veoma zastupljeni, nagoveštavajući da bi možda upravo ove grupe jedinjenja, a ne najdominantnije jedinjenje mogli biti odgovorni za stimulisanje “priming” odgovora kod krompira.

Zanimljivo da je aktivnost PAL1 gena, koji kodira enzim fenil alanin lijazu koji katalizuje konverziju fenil alanina u SA (Yalpani et al., 1993) u biljkama krompira bila čak suprimirana nakon delovanja etarskog ulja *T. vulgare* skoro tokom čitavog perioda trajanja tretmana.

Za razliku od studija koje se bave istraživanjima potencijala etarskih ulja da indukuju “priming” efekat u borbi protiv mikrobnih patogena, malo je istraživanja u kojima je opisan efekat sekundarnih metabolita na “priming” reakcije usmerene protiv insekata. Uglavnom se ispitivanja odnose na efekat emitovanih isparljivih jedinjenja na predatore herbivornih insekata koji ovim jedinjenjima bivaju privučeni ka biljci koja ih je kao “poziv u pomoć” odaslala. Međutim, zanimljivo je istražiti kako ovi signali deluju na okolne biljke i da li imaju potencijal da indukuju ekspresiju gena uključenih u odbranu od insekata. U ovim odbrambenim reakcijama umesto SA odlučujuću ulogu ima jasmonska kiselina (JA) i njeni derivati, koji deluju kao regulatorni faktori koji učestvuju u regulaciji ekspresije gena uključenih u metabolizam ovih jedinjenja. Proučavajući efekat isparljivih jedinjenja koja su se oslobodila nakon napada paučinara kod susednih biljaka pasulja Arimura i sar. (2000) su potvrdili indukciju 6 odbrambenih gena. Među njima je i LOX gen koji kodira lipoksigenazu, ključni enzim u putu biosinteze JA, čija je potvrđena indukcija dovela do aktiviranja i drugih odbrambenih gena.

Jedan od tih gena koji su regulisani nivoom JA a za koji se zna da direktno deluje na rastenje i razviće insekata herbivora jeste i *Pin2* koji kodira inhibitor proteinaza prisutnih u digestivnom sistemu ovih štetočina. Kao i svi inhibitori proteinaza nakon unosa putem hrane u digestivnom sistemu se ireverzibilno vezuje za proteinaze čime sprečava proteolizu hrane i umanjuje efikasnost ishrane koja će imati posledice po rastenje i razviće insekata, a može da dovede i do smrti. Nakon izlaganja biljaka krompira etarskom ulju *T. vulgare* došlo je do indukcije ekspresije ovog gena, ali je ona u odnosu na gene regulisane SA dosta kasnila i bila značajno manjeg intenziteta. Maksimum u ekspresiji ovoga gena dostignut je tek nakon 48 sati od izlaganja delovanju ulja ali je nakon 72 h ekspresija vraćena na kontrolni nivo. Potpuno različiti obrazac indukcije kao i značajno slabiji nivo ekspresije ukazuje da je etarsko ulje *T. vulgare* potentnije u indukciji prajminga usmerenog ka odbrani od patogena u odnosu na insekte štetočine. Nije neobično da odgovor iste biljke na različita jedinjenja bude potpuno drugačiji, što ukazuje na značaj hemijske prirode “priming” stimulusa u indukciji odbrambenog odgovora. Iako mehanizmi ove indukcije ostaju nedovoljno razjašnjeni ne sme se zanemariti ni uloga pojedinačnih receptora, signalnih molekula i ostalih komponenti ovog složenog odgovora.

Jedna od prednosti uvođenja biljke u stanje indukovane odbrane pre direktnog izlaganja stresnom faktoru, bio on biotičke ili abiotičke prirode, jeste neremećenje fitnesa biljke. “Priming” stimulus treba da indukuje odbranu, ali i da ne dovede do drastično izmenjenog metabolizma koji bi skrenuo u peavcu intenzivne produkcije odbrambenih resursa na uštrb primarnog metabolizma. Ovo je posebno važno kod poljoprivrednih kultura kod kojih bi velike promene u prinosu i nutritivnom kvalitetu kao posledica “priming” delovale potpuno ne afirmativno za sprovođenje ovakvih mera zaštite. S druge strane, prvi koraci u odbrambenom odgovoru biljke i signalnoj kaskadi koja se pokreće nakon delovanja stimulusa su vezani za membrane i za brzu produkcija vrlo reaktivnih i toksičnih kiseoničnih vrsta, čija akumulacija može dovesti do geneze oksidativnog stresa. Među različitim vrstama ROS, slobodnodifundujući i relativno dugoživeći molekul  $H_2O_2$  ima centralnu funkciju u putevima signalne transdukcije tokom stresa. Male dimenzije i relativno dug život ovog molekula omogućuju da  $H_2O_2$  prolazi kroz membrane i ulazi u različite ćelijske odeljke što olakšava njegovu signalnu funkciju (Noctor i sar., 2014). Ovi

putevi zatim aktiviraju različite odgovore na biotičke i abiotičke stresore. Međutim, da bi se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koristio kao signalni molekul njegova netoksična koncentracija mora da se održava u delikatnom balansu između njegove produkcije i eliminisanja (Hossain i sar., 2015). Smatra se da je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalni molekul koji učestvuje i u aktivaciji rezistentnosti na patogene (Pastor i sar., 2013). Pastor i saradnici (2010) su ispitali ulogu ROS u rezistenciji prema *Plectosphaerella cucumerina*, indukovanoj sa  $\beta$ -amino butiričnom kiselinom (BABA). Uočeno je da su biljke koje su tretirane BABA a zatim suočene sa patogenom, produkovale više H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na biljke tretirane samo vodom.

Takođe, egzogena aplikacija flavonoidnog derivata *o*-hidroksietilorutina na biljke paradajza indukuje rezistenciju na *Botrytis cinerea* što uzrokuje povećanu akumulaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ranim koracima u poređenju sa biljkama paradajza tretiranih vodom (Malolepsza, 2005). Pored toga što učestvuje u promociji oksidativnog praska i što ima funkciju odbrambenog signala, Luna i saradnici (2011) su ukazali na to da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posreduje u taloženju kaloze što je odgovor na infekciju sa bakterijskim ili gljivičnim patogenima. Zimmerli i saradnici (2000) su pokazali da kod biljaka *A. thaliana* koje su bile u stanju indukovane odbrane delovanjem BABA, dolazi do povećane akumulacije PR-1 transkripta nakon infekcije sa *P. syringae* i da ove biljke u stanju indukovane odbrane modifikuju ROS homeostazu i pokazuju povećan nivo akumulacije kaloze nakon infekcije. Ton i Mauch-Mani (2004) su pokazali da biljke *A. thaliana* akumuliraju kalozu nakon infekcije gljivičnim patogenom. Stoga, uloga H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i njegova interakcija u akumulaciji kaloze ukazuje na to da je za rezistenciju indukovanu "priming" signalom neophodna odgovarajuća ROS homeostaza. Toksičnost i pretnja po ćeliju povezane sa produkcijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sa jedne strane i signalne kaskade sa druge strane čine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> svestranim molekulom čija koncentracija u ćeliji mora da bude precizno kontrolisana (Petrov i VanBreusegem, 2012).

Razumevanje suptilnih i osetljivih mehanizama kojima biljke blago povećavaju titar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> što je u vezi sa signalnim kaskadama koje potom slede daće doprinos mozaičnoj slici funkcija ovog molekula u biljnoj ćeliji. U prilog navedenim studijama idu i rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji u kojima je analizirana aktivnost CAT, jednog od najzastupljenijih i najaktivnijih enzima koji uklanjaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz biljne ćelije. Pokazano je da

nakon delovanja etarskog ulja *T. vulgare* i indukcije odbrambenog odgovora detektovanog kroz povećanu ekspresiju pojedinih gena (*PR-2*, *PR-5*, *Pin2*) ne dolazi do značajnog povećanja u aktivnosti ovog enzima. Čak štaviše, u tačkama u kojima je dolazilo do najintenzivnije ekspresije odbrambenih gena primećena je blaga smanjenje u aktivnosti CAT. Ovo ukazuje na to da etarsko ulje nije izazvalo oksidativni stres praćen naglim povećanjem aktivnosti CAT kao odgovor na eventualnu povećanu produkciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, već da su biljke krompira održale ROS homeostazu i nakon izlaganja ulju.

\*\*\*

*Tanacetum vulgare* L. od davnina je smatran eliksirom besmrtnosti i često korišćen u narodnoj medicini za tretiranje različitih tegoba. I pre nego što je savremenim metodama i tehnikama bilo moguće determinisati i okarakterisati hemijski sastav ekstrakata i etarskog ulja ove vrste bio je pokazan širok spektar bioloških aktivnosti sekundarnih metabolita ove biljke. Zbog toga ova vrsta i dalje izaziva veliko interesovanje, a rezultati izloženi u ovoj disertaciji doprinose rasvetljavanju hemijske prirode i mehanizama odgovornih za raznovrsne biološke aktivnosti koje ova vrsta pokazuje.

Uspostavljanjem *in vitro* kulture i optimizacijom protokola za gajenje i multiplikaciju izdanaka i korenova, omogućena je produkcija uniformnog materijala koja omogućava analizu komponenti sekundarnog metabolizma pod strogo kontrolisanim uslovima, čime se izbegava nestabilnost u sastavu i koncentraciji hemijskog sastava koja u prirodi nastaje kao posledica delovanja uslova sredine u kojima biljka raste (Robles i Garzino, 2000; Demetzos i sar. 2002). Takođe, dobro razvijeni protokoli za *in vitro* gajenje biljaka predstavljaju i preduslov za otvaranje novih pravaca istraživanja kojima bi se moglo uticati na produkciju sekundarnih metabolita manipulacijom hemijske i fizičke mikrosredine, dodavanjem prekursora, aplikacijom elicitora ili genetičkom transformacijom kojom bi se uticalo na na ekspresiju gena koji čine biosintetski put ciljnog jedinjenja.

Dobru polaznu tačku za ovakva istraživanja daju i rezultati analiza hemijskog sastava etarskog ulja i metanolnih ekstrakata, kako iz biljaka sakupljenih u prirodi tako i onih

gajenih *in vitro*, koji su pokazali da je način gajenja ovih biljaka značajno uticao na sastav sekundarnih metabolita. Posebno je značajno da je u metanolnom ekstraktu korena gajenog *in vitro* relativna zastupljenost 3,5-*O*-dikefeolihininske kiseline bila i 7 puta veća nego u metanolnim ekstraktima herbe i korena biljaka iz prirode, a upravo je ovo jedinjenje poznato po izuzetno visokom antioksidativnom kapacitetu i sposobnosti da inhibira integraciju virusa humane imunodeficijencije (HIV-1) i blokira njegovu replikaciju *in vitro*, zahvaljujući čemu se smatra da ima veliki terapijski potencijal u terapiji HIV infekcije (Tamura i sar., 2006). Zanimljivo je i da je raznovrsnost jedinjenja okarakterisanih u etarskom ulju bila veća kod biljaka gajenih *in vitro* naročito iz grupe seskviterpena. Ipak zbog smanjenog prinosa i limitacija, pre svega prostornih ali i ekonomskih, koje sa sobom nosi gajenje biljaka u laboratorijskim uslovima, dobijanje zadovoljavajuće količine etarskog ulja iz biljaka gajenih *in vitro* najčešće je objektivni problem. Uvođenje bioreaktora velikih kapaciteta i masovna mikropropagacija kultura izdanaka i korenova mogao bi da bude način kojim bi se ovaj problem prevazišao (Werner i sar. 2017). Iako su metanolni ekstrakti stabljike, lista, cveta i korena, kao i etarsko ulje dobijeni iz biljaka raslih u prirodi pokazali širok spektar bioloških aktivnosti, od značaja bi bilo uporediti ih sa aktivnostima sekundarnih metabolita iz *in vitro* biljaka. 3,5-*O*-dikefeolihininska kiselina, kojoj se pripisuje izuzetna antioksidativna aktivnost dobijena kod analiziranih ekstrakata, a koja je detektovana u velikoj količini kod *in vitro* biljaka mogla bi da bude označena kao jedinjenje od interesa za dalja istraživanja. Dalji rezultati pokazuju i da ovo i njemu slična jedinjenja iz ekstrakata zahvaljujući visokoj antioksidativnoj aktivnosti koju su pokazala na direktan ili indirektan način mogu uticati i pojave koje dovode do oogeneze ili infekcija patogenim mikroorganizmima.

Posebno zanimljiva je i pokazana aktivnost etarskog ulja *T. vulgare* na larve gubara, ali i na biljke krompira koje su rasle u atmosferi zasićenoj isparljivim jedinjenjima ovog ulja. U oba slučaja pokazanje potencijal za korišćenje ovog ulja u cilju prevencije štete koju insekti štetočine nanose gajenim kulturama. To bi mogao da bude veoma značajan rezultat s obzirom da i pored svih napora koji se ulažu u promovisanje i razvijanje alternativa hemijskim pesticidima koje se baziraju na korišćenju fitohemijskih biopesticida, savremeni podaci pokazuju da svega 1% od svih pesticida koji se danas koriste spada u grupu

biopesticida (Walia i sar., 2017). Sa korišćenjem nikotina, kao prve generacije biopesticida, krenulo još 90-tih godina XX veka (Ujvary, 1999), ali je zbog visoke toksičnosti prema sisarima i visokom stepenu rizika koje predstavlja po ljudsko zdravlje i okolinu izbačeno iz upotrebe. Osim nikotina slično se desilo i sa nekim drugim prirodnim jedinjenjima kao što su rotenon, piretrini i *Sabadilla* alkaloidi koji su takođe pokazivali visok stepen štetnosti na neciljane organizme. Danas postoje različite formulacije sprejeva, uljnih rastvora, grnula ili čvrstih preparata koji su od strane US Food and Drug Administration prepoznati kao bezbedni biopesticidi. Među njima najzastupljeniji su preparati bazirani na etarskim uljima limun trave (*Cimnopogonwinteriana*), karanfilića (*Eugenia caryophyllus*), bosiljka (*Ocimumbasilicum*), eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*), ruzmarima (*Rosmarinusofficinalis*), vetivera (*Vetiveriazizanioides*), kadifice (*Tageteserecta*), majčine dušice (*Thymus vulgaris*), zimzelena (*Gaultheria procumbens*), cimeta (*Cinnamomumzeylanicum*), lavande (*Lavandulaangustifolia*(syn. *L. officinalis*), iđirota (*Acoruscalamus*), kumina (*Cuminumcyminum*), crnog kumina (*Buniumpersicum*), ajovana (*Trachyspermumammi*), komorača (*Foeniculumvulgare*), muska (*Abelmoschusmoschatus*). Ipak, za korišćenje etarskih ulja i sekundarnih metabolita kao biopesticida neophodno je prevazići nekoliko trenutnih problema pre njihove komercijalizacije. Naime, osnovni problem sa kojim bi se proizvođači ovih alternativnih pesticida susretali odnosi se na izuzetno nisku rastvorljivost ovih jedinjenja u vodi. Stoga se većina ovih jedinjenja rastvara i razblažuje u organskih rastvaračima (alkoholima, hlorovanim ugljenim hidratima i nitrilima) pri čemu se rastvarači najčešće koriste u izuzetno velikim količinama (Anjali i sar., 2010). Poslednjih godina radi se veoma intenzivno na pronalaženju alternativnih rastvarača, koji bi bili manje toksični za same biljke i okolinu, jeftini i laki za korišćenje, a sve u skladu sa postojećom sve strožijom zakonskom regulativom koja se bavi pitanjima zaštite životne sredine (Smith, 2014). Nova klasa tzv. “zelenih medijuma” (NADES; eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*), nametnula se kao moguće rešenje koje ispunjava većinu napred opisanih kriterijuma, predstavljajući veliki potencijal za agrohemijску industriju (Choi i sar., 2011). NADES su najčešće sačinjeni od biljnih jedinjenja i to najčešće produkata primarnog metabolizma. Naime, prilikom pronalaženja jedinjenja koja bi odgovarala ovoj nameni pošlo se od pretpostavke da se u biljkama već nalaze rastvarači koji nisu voda ili lipidi a koji bi bili analozi

sintetičkim rastvaračima. Postojanje ovakvih rastvarača koji zapravo predstavljaju DES smeše, objašnjava određene biohemijske procese kao što su biosinteza, transport i skladištenje pojedinih teško rastvorljivih jedinjenja (Choi i sar., 2011). Do sada je formulisano više od 100 stabilnih kombinacija NADES u čiji sastva ulaze amino kiseline, organske kiseline, šećeri i holinski derivati (Dai i sar., 2013), a njihova osnovna prednost je značajno snižavanje temperature topljenja u odnosu na temperature pojedinačnih komponenti čime rastvori na sobnoj temperature ostaju u tečnom stanju.

## 6. ZAKLJUČCI

- \* Uspešno je uspostavljena *in vitro* kultura *Tanacetum vulgare* L. iz semena biljaka sakupljenih u prirodi. Biljke dobijene *in vitro* su uspešno umnožavane na podlozi sa dodatkom BAP koncentracije 0,5 mg/L a zatim ožiljavane na podlozi obogaćenoj sa IBA koncentracije 0,2 mg/L. *In vitro* kultura korenova uspostavljena je u tečnoj podlozi sa dodatkom IBA koncentracije 0,5 mg/L.
- \* Histochemijskom analizom utvrđeno je da su na listovima *in vitro* gajenih biljaka prisutne biserijadne glandularne trihome sa sekrecionim sadržajem u kojem su detektovani lipidi, terpeni i alkaloidi.
- \* Hemijska karakterizacija etarskog ulja biljaka iz prirode pokazala je prisustvo 65 isparljivih komponenti od kojih je 58 identifikovano. Najzastupljenija jedinjenja u sastavu etarskog ulja su: *trans*-hrisantenil acetat (41.37%), *trans*-hrizantenol (12.51%), *trans*-tujon (9.04%) i *cis*-tujon (5.28%). Na osnovu kvalitativnog i kvantitativnog sastava ulje je opisano kao *trans*-hrisantenil acetatni hemotip.
- \* Hemijskom analizom etarskog ulja biljaka *T. vulgare* gajenih *in vitro* detektovano je 88 isparljivih jedinjenja od kojih je 42 identifikovano, što predstavlja 72,3% ukupnog sadržaja ulja. U ukupnom sadržaju etarskog ulja sa 40% su zastupljeni monoterpeni a sa 33,4% seskviterpeni. Dva jedinjenja koja određuju hemotip i dominiraju u etarskom ulju *in vitro* biljaka su oksidovani monoterpen *trans*-tujon (22,7%) i oksidovani seskviterpen neril izovalerat (20,6%).
- \* Hemijskom analizom metanolnih ekstrakata cveta, lista, stabljike i korena biljaka iz prirode detektovano je 36 jedinjenja od kojih je identifikovano 25. Utvrđeno je da su fenolne kiseline i flavonoidi zajedno sa njihovim derivatima glavne komponente metanolnih ekstrakata. Najzastupljenija jedinjenja su fenolne kiseline iz grupe derivata cimetine kiseline i to: neohlorogena, 3,5-*O*-dikafeoilhininska i



dikafeoilhininska kiselina. Pored fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima *T. vulgare* je detektovano i 17 flavonoida. Relativni udeo fenolnih kiselina i flavanoida se razlikovao u zavisnosti od dela biljke korišćenog za pripremanje metanolnog ekstrakta.

- \* Hemijska analiza metanolnih ekstrakata herbe i korena *in vitro* biljaka ukazala je na to da su ekstrakti biljaka gajenih *in vitro* kvalitativno siromašniji u odnosu na metanolne ekstrakte biljaka iz prirode ali su se pritom ekstrakti biljaka *in vitro* odlikovali višestruko većom zastupljenošću 3,5-*O*-dikafeoilhininske kiseline.
- \* Metanolni ekstrakti cveta, lista, stabljike i korena *T. vulgare* pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost koja korelira sa sadržajem ukupnih fenola u ekstraktima. Najveću antioksidativnu aktivnost ispoljio je metanolni ekstrakt korena.
- \* Etarsko ulje i metanolni ekstrakti cveta, lista, stabljike i korena *T. vulgare* ispoljavaju antimikrobnu aktivnost. Etarsko ulje *T. vulgare* ispoljilo je jako antimikrobno dejstvo prema većini ispitivanih bakterijskih (5 od analiziranih 8) i svih 8 vrsta mikromiceta. Gram (-) *E. coli* i *E. cloacae* su bile najsenzitivnije na dejstvo etarskog ulja. Metanolni ekstrakti korena, lista, cveta i stabljike *T. vulgare* ispoljili su jaku antimikrobnu aktivnost na sve testirane vrste bakterija i većinu mikromiceta. Stoga bi se etarsko ulje i metanolni ekstrakti *T. vulgare* bi se mogli preporučiti u prevenciji i lečenju infekcija izazvanih vrstama prema kojima je pokazana visoka aktivnost ali i kao agensi u konzerviranju i očuvanju kvaliteta namirnica u prehrambenoj industriji.
- \* Testom *in vitro* citotoksičnosti na tumorske HeLa ćelije pokazano je da su metanolni ekstrakti lista i cveta ispoljili jak citotoksični efekat na ciljne ćelije koji je bio značajno viši od efekta koji su izazvali ekstrakti stabljike i korena, dok je etarsko ulje ispoljilo najslabiju citotoksičnost. Metanolni ekstrakti lista i cveta ispoljili su značajnu citotoksičnost koja se kretala u mikrogramskim

koncentracijama (do 100 µg). Nakon tretmana metanolnim ekstraktima lista i cveta, kod HeLa ćelija je primećeno skupljanje membrane i zaokrugljivanje ćelija dok je kod većine ćelija došlo je do gubitka adhezije što je ukazivalo na ćelijsku smrt.

- \* Etarsko ulje *T. vulgare* nije ispoljilo akutnu toksičnost i povećanje mortaliteta gusenica gubara (*Lymantria dispar* L.) ali je izazvalo odlaganje presvlačenja i značajno smanjenje procenta presvučenih gusenica. Ingestija etarskog ulja uticala je značajno na rastenje i razviće gusenica četvrtog stupnja razvića tako što je smanjila dnevni prirast mase gusenica i brzinu konzumacije hrane, te su gusenice gubara unosile sve manje hrane po mg sopstvene mase. Smanjenje konverzije svarene hrane u biomasu gusenica se nije pokazalo kao statistički značajno pa se može zaključiti da je time smanjen negativni efekat ingestije etarskog ulja i delom kompenzovan smanjeni unos hrane izazvan prisustvom etarskog ulja.
- \* Analiza ispitivanja aktivnosti etarskog ulja *T. vulgare* u indukciji odbrambenih mehanizama krompira (*Solanum tuberosum* L.) gajenog *in vitro* pokazano je da su isparljiva jedinjenja etarskog ulja dovela do statistički značajnih razlika u nivou ekspresije svih analiziranih gena tokom 72 h. Prisustvo etarskog ulja izazvalo je najintenzivniju indukciju kod dva analizirana PR gena, PR-2 i PR-5. Prve promene u ekspresiji uočene su nakon 8 h od izlaganja, a maksimum ekspresije od oko 50 puta zabeležen je za PR-2 gen nakon 12 h.
- \* Na osnovu preliminarne PTR-MS analize i merenja zastupljenosti pojedinačnih jedinjenja etarskog ulja u atmosferi teglica u kojima je bio krompir, dominantno jedinjenje ulja, *trans*-hrizantenil acetat bio je znatno manje zastupljen od monoterpenskih ugljovodonika  $\alpha$ -pinena i *p*-cimena. Pored ovih jedinjenja i artemizia-keton, *cis*-tujon, *trans*-tujon i kamfor su bili veoma zastupljeni, nagoveštavajući da bi možda upravo ove grupe jedinjenja mogle biti odgovorne za indukciju odbrane krompira.

**LITERATURA**

- Abad MJ, Bermejo P, Villar A, Valverde S (1993) Anti-Inflammatory activity of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum*. J Nat Prod 56:1164-1167.
- Abbasay MA, Abdelgaleil SAM & Rabie RYA (2009) Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents. Entomol Exp Appl 131:225-232.
- Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. J Am Chem Soc 126:9142-9147.
- Abdelgaleil SAM, Badawy MEI, Mohamed MIE, Shawir MS (2012) Chemical composition and fumigant toxicity of essential oils isolated from Egyptian plants against stored product insects *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). In: Proc 9th. Int. Conf. on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products (Editors Navarro S, Banks HJ, Jayas DS, Bell CH, Noyes RT, Ferizli AG, Emekci M, Isikber AA, Alagusundaram K) Antalya, Turkey, 15-19 October 2012, ARBER Professional Congress Services, Turkey pp: 50-57.
- Abdin M Z, Rehman RU, Israr M, Srivastava P S, Bansal KC (2002) Abiotic stress related genes and their role in conferring resistance in plants. Indian J Bot 1:225-244.
- Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4<sup>th</sup> ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA. pp. 469.
- Adeyemi MMH (2010) The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests: A review. African J Pure App Chem 4:243-246.
- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. Methods Enzymol 105:121-126.
- Affonso VR, Bizzo HR, Lage CLS, Sato A (2009) Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of *in vitro* Plantlets of *Thymus vulgaris* L. J Agric Food Chem 57:6392-6395.

- Agarwal V, Lal P, Pruthi V (2010) Effect of plant oils on *Candida albicans*. J Microbiol Immunol Infect 43:447-451.
- Agrawal AA, Conner KJ, Stinchcombe RJ (2004) Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. Ecol Lett 7:1199-1208.
- Aharoni A, Jongsma MA, Bouwmeester HJ (2005) Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. Trends Plant Sc 12:594-602.
- Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Goya L (2006) Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). Eur J Nutr 45:19-28.
- Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J Agric Food Chem 40:4168-4170.
- Allahverdiyev A, Duran N, Ozguven M, Koltas S (2004) Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. Phytomed 11:657-661.
- Alvarez Castellanos PP, Pascual-Villalobos MJ (2003) Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. Ind Crop Prod 17:77-81.
- Álvarez ÁL, Habtemariam S, Abdel Moneim AE, Melón S, Dalton KP, Parra F (2015) A spiroketal-enol ether derivative from *Tanacetum vulgare* selectively inhibits HSV-1 and HSV-2 glycoprotein accumulation in Vero cells. Antivir Res 119:8-18.
- Alves MJ, Ferreira IC, Froufe HJ, Abreu RMV, Martins A, Pintado M (2013) Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. J Appl Microbiol 115:346-357.
- Alviano DS, Alviano CS (2009) Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. Curr Pharm Biotechnol 10:106-121.
- Amigo-Benavent M, Wang S, Mateos R, Sarriá B, Bravo L (2017) Antiproliferative and cytotoxic effects of green coffee and yerba mate extracts, their main

- hydroxycinnamic acids, methylxanthine and metabolites in different human cell lines. *Food Chem Toxicol Pt A*:125-138.
- Anjali CH, Khan SS, Goshen KM, Magdassi S, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2010) Formulation of water-dispersible nanopermethrin for larvicidal applications. *Ecotoxic Environ Safe* 73:1932-1936.
- Arimura G, Matsui K, Takabayashi J (2009) Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiol* 50:911-923.
- Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabyashi J (2000) Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406:512-515.
- Armstrong JS (2006) Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays*. 28:253-260.
- Arts ICW (2008) A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoids, and lung cancer. *Journal Nutr* 138:1561-1566.
- Asai N, Nishioka T, Takabayashi J, Furuichi T (2009) Plant volatiles regulate the activities of Ca<sup>2+</sup>-permeable channels and promote cytoplasmic calcium transients in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Signal Behav* 4:294-300.
- Ashour M, Wink M, Gershenzon J (2010) Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. In: *Annual plant reviews Volume 40 - Biochemistry of plant secondary metabolism, 2<sup>nd</sup> Edition* (Editor Wink M). Wiley-Blackwell, Oxford, UK. doi: 10.1002/9781444320503.ch5.
- Avato P, Fortunato IM, Ruta C, D'Elia R (2005) Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Sci* 169:29-36.
- Azmi AS, Bhat SH, Hanif S, Hadi SM (2006) Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: A putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett* 580:533-538.
- Bączek KB, Kosakowska O, Przybył JL, Pióro-Jabrucka E, Costa R, Mondello L, Gniewosz M, Synowiec A, Węglarz Z (2017) Antibacterial and antioxidant activity

- of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Ind Crop Prod* 102:154-163.
- Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J (2004) Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol* 21:33-42.
- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63:147-173.
- Bairu MW, Stirk WA, Doležal K, Van Staden J (2007) Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatine? *Plant Cell Tiss Org Cult* 90:15-23.
- Baker JR (1966) *Cytological Technique: The Principles Underlying Routine Methods* (5<sup>th</sup> Edition). Methuen & Co, London, UK.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol* 46:446-475.
- Balandrin MJ, Klocke JA (1988) Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In: *Biotechnology in agriculture and forestry* (Editor Bajaj YPS). *Medicinal and Aromatic Plant*, vol. 4. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp.1-36.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 99:191-203.
- Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, von Dahl CC, Preston CA (2006) Volatile signaling in plant-plant interactions: "Talking Trees" in the genomics era. *Science* 311: 812-815.
- Baldwin IT, Schultz JC (1983) Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science* 221:277-279.
- Balkema-Boomstra AG, Zijlstra S, Verstappen FWA, Inggamer H, Mercke, PE, Jongasma MA, Bouwmeester HJ (2003) Role of cucurbitacin C in resistance to spider mite (*Tetranychus urticae*) in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Chem Ecol* 29:225-235.

- Ballhorn DJ, Kautz S, Jensen M, Schmitt S, Heil M, Hegeman AD (2011) Genetic and environmental interactions determine plant defences against herbivores. *J Ecol* 99:313-326.
- Balmer A, V Pastor, J Gamir, V Flors, B Mauch-Mani (2015) The 'prime-ome': towards a holistic approach to priming. *Trends Plant Sci* P20:443-452.
- Banthorpe DV, Brown GD (1989) Two unexpected coumarin derivatives from tissue cultures of compositae species. *Phytochem* 28:3003-3007.
- Banthorpe DV, Wirz-Justice A (1972) Tanacetum. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*:1769-1772.
- Baranauskienė R, Kazernaškaitė R, Pukalskienė M, Maždžierienė R, Venskutonis PR (2014) Agrorefinery of *Tanacetum vulgare* L. into valuable products and evaluation of their antioxidant properties and phytochemical composition. *Ind Crop Prod* 60:113-122.
- Barbehenn R, Cheek S, Gasperut A, Lister E, Maben R (2005) Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. *J Chem Ecol* 31:969-988.
- Barrero AF, Oltra JE, Álvarez M, Raslan DS, Saúde DA, Akssira M (2000) New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia* 71:60-64.
- Barrero AF, Sánchez JF, Altarejos J, Zafra MJ (1992) Homoditerpenes from the essential oil of *Tanacetum annuum*. *Phytochem* 31:1727-1730.
- Barthomeuf C, Hitmi A, Veisseire P, Coudret A (1996) Identification and assay of pyrethrins in *Chrysanthemum cinerariaefolium* calli. *Biotech Technol* 10:639-642.
- Basnet P, Matsushige K, Hase K, Kadota S, Namba T (1996) Four di-*O*-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent Hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol Pharm Bull* 19:1479-1484.
- Bate NJ, Rothstein SJ (1998) C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J* 16:561-569.
- Bauer K, Garbe D, Surburg H (2001) Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. Wiley-VCH, Weinheim, Germany pp. 293.

- Baur R, Binder S, Benz G (1991) Nonglandular leaf trichomes as short-term inducible defense of the grey alder, *Alnus incana* (L), against the chrysomelid beetle, *Agelastica alni* L. *Oecologia* 87:219-226.
- Benz BW, Martin CE (2006) Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in the species of epiphytic *Tillandsia* (Bromeliaceae). *J Plant Physiol* 163:648-656.
- Bernard L, Lagadic L (1993) Sublethal effects of dietary cyfluthrin on nutritional performance and gut hydrolase activity in larvae of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Pesticide Biochem Physiol* 46:171-180.
- Bettaieb I, Zakhama N, Aidi Wannas W, Kchouk ME, Marzouk B (2009) Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Sci Hort* 120:271-275.
- Betts TJ (2001) Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *J Chrom a.* 936:33-46.
- Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V (2013) Anticancer activity of essential oils: a review. *J Sci Food Agr* 93:3643-3653.
- Bhat R, Rai RV, Karim AA (2010) Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. *Compr Rev Food Sci F* 9:57-81.
- Bishop CD (1995) Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maidenamp; Betche) Cheel (tea tree) against Tobacco Mosaic Virus. *J Essential Oil Res* 7:641-644.
- Bodake HB, Panicker KN, Kailaje VV, Rao KV (2002) Chemopreventive effect of orange oil on the development of hepatic preneoplastic lesions induced by N-nitrosodiethylamine in rats: an ultrastructural study. *Indian J Exp Biol* 40(3):245-51.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099-1111.
- Boland W, Krumm T, Koch T, Piel J, Jux A (1999) Insect-plant interactions and induced plant defense. *Novartis Symposium* 223:110-126.



- Booth C (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, London, UK. pp. 237.
- Boros B, Farkas A, Jakabová S, Bacskay I, Killár F, Felinger A (2010) LC-MS Quantitative determination of atropine and scopolamine in the floral nectar of *Datura Species*. *J Chromatogr* 71:43-49.
- 
- Bosabalidis A, Tsekos I (1982) Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. L Early stages of the gland cells differentiation. *Protoplasma* 112:55-62.
- Boughton AJ, Hoover K, Felton GW (2005) Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *J Chem Ecol* 31:2211-2216.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use a free radical method to evaluate antioxidative activity. *LWT - Food Sci Technol* 28:25-30.
- Brechu-Franco AE, Laguna-Hernández G, De-la-Cruz-Chacón I, González-Esquinca AR (2016) *In situ* histochemical localization of alkaloids and acetogenins in the endosperm of embryonic axis of *Annona macroprophyllata* Donn.Sm. seed during germination. *Eur J Histochem* 60:2568.
- Brehm-Stecher BF, EA Johnson (2003) Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. 47:3357-3360.
- Brenes A, Roura E (2010) Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Anim Feed Sci Technol* 158:1-14.
- Broderick AN, Goodman R, Raffa FK (2000) Synergy between Zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environ Entomol* 29:101-107.
- Brotman Y, Lisec J, Méret M, Chet I, Willmitzer L, Viterbo A (2012) Transcript and metabolite analysis of the Trichoderma-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiol* 158:139-146.

- Brown AMG, Edwards CM, Davey MR, Power JB, Lowe KC (1997) Effects of extracts of *Tanacetum* species on human polymorphonuclear leucocyte activity *in vitro*. *Phytother Res* 11:479-484.
- Brown AMG, Edwards CM, Hartman TPV, Marshall JA, Smith RM, Davey MR, Power JB, Lowe KC (1999) Sexual hybrids of *Tanacetum*: biochemical, cytological and pharmacological characterization. *J Expl Bot* 50:435-444.
- Brown AMG, Lowe KC, Davey MR, Power JB (1996) Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): tissue culture and parthenolide synthesis. *Plant Sci* 116:223-232.
- Buchel AS, Linthorst HJM (1999) PR1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: *Pathogenesis-related proteins in plants* (Editors Datta SK, Muthukrishnan S). CRC Press LLC, Boca Raton, USA, pp. 21-47.
- Burkhardt S, Reiter RJ, Tan DX, Hardeland R, Cabrera J, Karbownik M (2001) DNA oxidatively damaged by chromium (III) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *Int J Biochem Cell Biol* 33:775-783.
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- review. *Int J Food Microbiol* 94:223-253.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74:2157-2184.
- Cain AJ (1947) The Use of Nile Blue in the Examination of Lipoids. *J Cell Sci* 88:383-392.
- Cal K (2006) Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta Med* 72:311-316.
- Calabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari A (2004) Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the *in vitro* growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 122:349-360.
- Cameron EA (1979) Disparlure and its role in gypsy moth population manipulation. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 52:333-342.

- Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH (2001) Antimycobacterial plant terpenoids *Planta Med* 67:685-694.
- Carneseccchi S, Bras-Gonçalves R, Bradaia A, Zeisel M, Gossé F, Poupon MF (2004) Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett* 215:53-59.
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV (2006) *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev* 19:50-62.
- Carson CF, Mee BJ, Riley TV (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 6:1914-1920.
- Carson CF, Riley TV (1993) Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Lett Appl Microbiol* 16:49-55.
- Casida JE (1973) *Pyrethrum*, the natural insecticide. Academic Press Inc. London, UK. pp. 323
- Casida JE (1980) *Pyrethrum* flowers and pyrethroid insecticide. *Environ Health Persp* 34:189-202.
- Cavalieri E, Mariotto S, Fabrizi C, de Prati AC, Gottardo R, Leone S, Berra LV, Lauro GM, Ciampa AR, Suzuki H (2004)  $\alpha$ -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 315:589-594.
- Chaubey MK (2008) Fumigant toxicity of essential oils from some common spices against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *J Oleo Sci* 57:171-179.
- Chen P, Kuo W, Chiang C, Chiou H, Hsieh Y, Chu S (2006) Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chem-Biol Interact* 163:218-229.

- Cheng SS, Chang HT, Wu CL, Chang ST (2007) Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. *Biores Technol* 98:456-459.
- Chiasson H, Belanger A, Bostanian N, Vincent C, Poliquin A (2001) Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *J Econom Entomol* 94:167-171.
- Chien SY, Wu YC, Chung JG, Yang JS, Lu HF, Tsou MF, Wood WG, Kuo SJ, Chen DR (2009) Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Hum Exp Toxicol* 28:493-503.
- Chinou I (2005) Labdanes of natural origin-biological activities (1981-2004). *Curr Med Chem* 12:1295-1317.
- Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, Lee MK (2010) Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol* 48:937-943.
- Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE, Witkamp GJ, Verpoorte R (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol* 156:1701-1705.
- Chu YF, Liu RH (2005) Cranberries inhibit LDL oxidation and induce LDL receptor expression in hepatocytes. *Life Sci* 77:1892-1901.
- Ciccarelli D, Garbari F, Pagni AM (2007) Glandular hairs of the ovary: a helpful character for Asteroideae (Asteraceae) taxonomy? *Ann Bot Fenn* 44:1-7.
- Cingel A, Savić J, Lazarević J, Ćosić T, Raspor M, Smigocki A, Ninković S (2016) Co-expression of the proteinase inhibitors Oryzacystatin I and Oryzacystatin II in transgenic potato alters Colorado Potato Beetle larval development. *Insect Sci* 00:1-13
- Cisplatin. The American Society of Health-System Pharmacists. [www.drugs.com/monograph/cisplatin.html](http://www.drugs.com/monograph/cisplatin.html) (Pristupljeno 13.05.2017.)

- Civjan N (2012) Natural products in chemical biology. Edited by Natanya Civjan. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, pp. 389
- Clifford MN (2000) Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 80:1063-1072.
- Cline GR, Sedlacek JD, Hillman SL, Parker SK, Silvernail AF (2008) Organic management of cucumber beetles in watermelon and muskmelon production. *Hort Technology* 18:436-444.
- Cloyd RA, Chiasson H (2007) Activity of an essential oil derived from *Chenopodium ambrosioides* on greenhouse insect pests. *J Econ Entomol* 100:459-466.
- CLSI (2009) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - Approved standard, 8<sup>th</sup> ed, M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA, USA. Vol. 29 No. 2. pp. 62.
- Collin GJ, Deslauriers H, Pageau N, Gagnon M (1993) Essential oil of Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) of Canadian origin. *J Essent Oil Res* 5:629-638.
- Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Man B (2002) Priming in plant – pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7:210-216.
- Cornu A, Carnat AP, Martin B, Coulon JP, Lamaison JL, Berdagué JL (2001) Solid-phase micro-extraction of volatile components from natural grassland plants. *J Agric Food Chem* 49:203-209.
- Cotelle N (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 6:569-590.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 88:170-175.
- Croteau R, El-Bialy H, Dehal SS (1987) Metabolism of monoterpenes. Metabolic fate of (+)-camphor in sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiol* 84:649-653.
- Croteau R, Felton M, Karp F, Kjonaas R (1981) Relationship of camphor biosynthesis to leaf development in sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiol* 67:820-824.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2006) Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the*

- human diet (Editors Crozier A, Clifford MN, Ashihara H). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. doi: 10.1002/9780470988558.ch1.
- Czarnecka AM, Golik P, Bartnik E (2006) Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J Appl Genet* 47:67-78.
- Da Silva JAT (2004) Mining the essential oils of the Anthemideae. *Afr J Biotechnol* 3:706-720.
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313-52.
- Dai Y, Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Cho YH (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* 766:61-68.
- Dajas F (2012) Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *J Ethnopharmacol* 143:383-396.
- 
- Dalin P, Ågren J, Björkman C, Huttunen P, Kärkkäinen K (2008) Leaf trichome formation and plant resistance to herbivory. In: *Induced plant resistance to herbivory* (Editor Schaller A). Springer Netherlands, Marine Science Institute, University of California, Santa Barbara, USA.
- Damianaki A, Bakogeorgou E, Kampa M, Notas G, Hatzoglou A, Panagiotou S, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E (2002) Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 78:429-441.
- David R, Carde JP (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 258:1338-1340.
- Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO (2009) Natural products in crop protection. *Bioorgan Med Chem* 17:4022-4034.
- De Martino L, de Feo V, Fratianni F, Nazzaro F (2009a) Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. *Nat Prod Comm* 4:1741-1746.

- De Martino L, de Feo V, Nazzaro F (2009b) Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven lamiaceae essential oils. *Molecules* 4:4213-4230.
- De Moraes CM, Lewis WJ, Paré PW, Alborn HT, Tumlinson JH (1998) Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393:570-573.
- De Moraes CM, Mescher MC, Tumlinson JH (2001) Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410:577-580.
- De Silva DLR, Hetherington AM, Mansfield TA (1996) Where does all the calcium go? Evidence of an important regulatory role for trichomes in two calcicoles. *Plant Cell Environ* 19:880-886.
- De Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattass CR (2004) *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol* 56:677-681.
- Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Inter J Food Microbiol* 74:101-109.
- Demetzos C, Anastasaki T, Perdetzoglou D (2002) A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in Crete (Greece). *Z Naturforsch* 57c:89-94.
- Dempsey DA, Klessig DF (2012) SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci* 17:538-545.
- Derksen H, Badawi M, Henriquez MA, Yao Z, El-Bebany AF, Daayf F (2013) Differential expression of potato defence genes associated with the salicylic acid defence signalling in response to weakly and highly aggressive isolates of *Verticillium dahlia*. *J Phytopath* 161:142-153.
- Di Matteo V, Esposito E (2003) Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Target CNS and Neurological Disorder* 2:95-107.

- Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G (2007) Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 55:4863-4870.
- Dicke M (1999a) Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomol Exp Appl* 91:131-142.
- Dicke M (1999b) Evolution of induced indirect defense of plants. In: *The ecology and evolution of inducible defenses* (Editors Tollrian R and Harvell CJ). Princeton, New Jersey: Princeton University Press, USA. pp. 62-88.
- Dicke M, Bruin J (2001) Chemical information transfer between plants: back to the future. *Biochem Syst Ecol* 29:981-994.
- Dicke M, Loon JJ (2000) Multitrophic effects of herbivore induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol Exp Appl* 97:237-249.
- Dijoux N, Guingand Y, Bourgeois C, Durand S, Fromageot C, Combe C, Ferret PJ (2006) Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicol in vitro* 20:480-489.
- Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, Castranova V, Jiang BH, Shi X (2006) Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J Biol Chem* 281:17359-17368.
- Dinis TC, Madeira VM, Almeida LM (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 315: 161-169.
- Dobos J, Földesi D, Zámbari-Német É (1992) Experiments for determination the optimum harvesting time of *Tanacetum vulgare* L. *Acta Horticult* 306:319-323.
- Dolan MC, G Dietrich, Panella NA, Monteneri JA, Karchesy JJ (2007) Biocidal activity of three wood essential oils against *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae), *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae), and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Econ Entomol* 100:622-625.
- Dorman HJD, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88:308-316.



- Dörnenberg H, Knorr D (1997) Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. *Food Technol* 51:47-54.
- Dragland S, Rohloff J, Mordal R, Iversen TH (2005) Harvest regimen optimization and essential oil production in five tansy (*Tanacetum vulgare* L.) genotypes under a Northern climate. *J Agr Food Chem* 53:4946-4953.
- Du Y, Poppy GM, Powell W, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM (1998) Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *J Chem Ecol* 24:1355-1368.
- Duclercq J, Sangwan-Noreell B, Catterou M, Sangwan R (2011) *De novo* shoot organogenesis: From art to science. *Trends Plant Sci* 16:597-606.
- Dudai N, Weinstein Y, Krup M, Rabinski T, Ofir R (2005) Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med* 71:484-488.
- Duke SO, Canel C, Rimando AM, Tellez MR, Duke MV, Paul RN (2000) Current and potential exploitation of plant glandular trichome productivity. *Adv Bot Res* 31:121-151.
- Edris AE (2007) Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res* 21:308-323.
- El Shazly A, Dorai G, Wink M (2002) Composition and antimicrobial activity of essential oil and hexane-ether extract of *Tanacetum santolinoides* (DC.) Feinbr Fertig J *Biosci* 57:620-623.
- Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R i sar (2005) Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J* 19:807-809.
- Elkinton JS, Liebhold AM (1990) Population dynamics of gypsy moth in North America. *Ann Rev Entomol* 35:571-596.
- Enan E (2001) Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp Biochem Phys C* 130:325-337.
- Enan EE (2005) Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Arch Insect Biochem Physiol* 59:161-171.

- Engelberth J, Alborn HT, Schmelz EA, Tumlinson JH (2004) Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1781-1785.
- Ennajdaoui H, Vachon G, Giacalone C, Besse I, Sallaud C, Herzog M, Tissier A (2010) Trichome specific expression of the tobacco (*Nicotiana sylvestris*) cembratrienol synthase genes is controlled by both activating and repressing cis-regions. *Plant Mol Biol* 73:673-85.
- Esmaeili AM, Sonboli A, Noushabadi MA (2010) Antioxidant and protective properties of six Tanacetum species against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in K562 cell line: A comparative study. *Food Chem* 121:148-155.
- Espinel-Ingroff A (2001) Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 39:1360-1367.
- Espino M, los Ángeles Fernández M, Gomez FJV, Silva MF (2016) Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *Tr AC Trend Anal Chem* 76:126-136.
- EUCAST (2002) Reference method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E. Dis. 7.1 ESCAMID. Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee.
- Evans WC (1996) Trease and Evans' Pharmacognosy 14<sup>th</sup> edition. WB Saunders, London, pp: 288.
- Evans WC (2002) Trease and Evans Pharmacognosy. 15th Ed., WB Sauners Co. Ltd., London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo.
- Fabian I, Reuveni D, Levitov A, Halperin D, Priel E, Shalit I (2006) Moxifloxacin enhances antiproliferative and apoptotic effects of etoposide but inhibits its proinflammatory effects in THP-1 and Jurkat cells. *Br J Cancer* 95:1038-1046.
- Fahn A (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108:229-257.
- Fahn A (2000) Structure and function of secretory cells. In: *Plant Trichomes* (Editors Hallahan DL and Gray JC). New York: Academic Press, New York, USA. pp. 37-75.

- Falk LK, Gershenzon J, Croteau R (1990) Metabolism of monoterpenes in cell cultures of common sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiol* 93:1559-1567.
- Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872-879.
- Farmer EE, Ryan CA (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7713-7716.
- Farmer EE, Ryan CA (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7713-7716.
- Fata F, Chittivelu S, Tessler S, Kupper Y (1996) Gas gangrene of the arm due to *Enterobacter cloacae* in a neutropenic patient. *South Med J* 89:1095-1096.
- Ferguson LR, Philpott M (2008) Nutrition and mutagenesis. *Annu Rev Nutr* 28:313-29.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr J* 23:213-226.
- Figueriedo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJ (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragrance J* 23:213-226.
- Fordyce AJ, Agrawal AA (2001) The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defence of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. *Animal Ecol* 70:997-1005.
- Fowler SV, Lawton JH (1985) Rapidly induced defenses and talking trees - the devil's advocate position. *Am Nat* 126:181-195.
- Fraga CG (2007) Plant polyphenols: how to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *IUBMB life* 59:308-315.
- Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MPM (2006) New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev* 26:747-766.

- Fukumoto LR, Mazza G (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agr Food Chem* 48:3597-3604.
- Furr M i Mahlberg PG (1981) Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *J Nat Prod* 44:153-159.
- Gabel B, Thiéry D (1994) Non-host plant odor (*Tanacetum vulgare*; Asteracea) affects the reproductive behavior of *Lobesia botrana* Den. et Schiff (Lepidoptera: Tortricidae) *J Insect Behav* 7:149.
- Gahan PB (1984) Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction. Academic press, Florida, USA. pp.301
- Gallino M (1988) Essential oil from *Tanacetum vulgare* growing spontaneously in 'Tierra del Fuego' (Argentina). *Planta Med* 54:182.
- Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygadlo J, Demo M (2009) Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr J* 24:348-354.
- Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygadlo J, Demo M (2009) Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr J* 24:348-354.
- Galvão LCC, Furletti VF, Bersan SMF, i sar. (2012) Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012:ID 751435.
- Gamir J, Pastor V, Kaefer A, Cerezo M, Flors V (2014), Targeting novel chemical and constitutive primed metabolites against *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J* 78:227-240.
- George EF, Hall MA, Klerk GJD (2008) Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: *Plant propagation by tissue culture* (George EF, Hall MA, Klerk GJD). Springer, Dordrecht, Germany. pp. 206-217.

- George J, Rajasekaran T, Ravishankar GA (1999) A modified culture vessel for improved callus growth and pyrethrins content of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). Pyret Post 20:49-54.
- Gerber M, Boutron-Ruault MC, Hercberg S, Riboli E, Scalbert A, Siess MH (2002) Food and cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. Bulletin du Cancer 89:293-312.
- Gershenzon J, Maffei M, Croteau R (1989) Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*) Plant Physiol 89:1351-1357.
- Gershenzon J, Maffei M, Croteau R (1989) Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). Plant Physiol 89:1351-1357.
- Ghalib RM, Mehdi SH, Hashim R, Sulaiman O, Ni Foong FH, Ahamed BMK, Majid AMSA, Ahmed F (2013) Eupalitin from *Asparagus falcatus* (Linn.) has anti-cancer activity and induces activation of caspases 3/7 in human colorectal tumor cells. J Med Plant Res 7:1401-1405.
- Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N (2010) What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? Drug Discov Today 15:668-678.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Biochem 48:909-930.
- Glas JJ, Schimmel BCJ, Alba JM, Bravo RE, Schuurink RC, MR Kant (2012) Plant Glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. Int J Mol Sci 13:17077-17103.
- Gleadow RM, Woodrow IE (2002) Defense chemistry of cyanogenic *Eucalyptus cladocalyx* seedlings is affected by water supply. Tree Physiol 22:939-945.
- Golob PS, Moss M, Dales M, Fidgen H, Evans J, Gudrups E (1999) The use of spices and medicinals as bioactive protectant for grains. Rome, F.A.O. p.239.

- Gören N, Bozak-Johansson C, Jakupovic J, Lin L, Shieh H, Cordell GA, Celik N (1992) Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum densum* subsp. *sivascium*. *Phytochem* 31:101-104.
- Gören N, Tahtasakal E (1996b) A guaianolide from *Tanacetum argenteum* subsp. *flabellifolium*. *Phytochem* 36:389-392.
- Gören N, Woerdenbag HJ, Bozak-Johansson C (1996a) Cytotoxic and antibacterial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Tanacetum praeteritum* subsp. *praeteritum*. *Planta Med* 62:419-422.
- Gospodinova Z, Antov G, Angelova S, Krasteva M (2014) *In vitro* antitumor potential of Bulgarian *Tanacetum vulgare* L. on human breast adenocarcinoma cells. *Inter J Pharma Sci* 4:468-472.
- Grice HP (1988) Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem Toxicol* 26:717-723.
- Grieve M (1984) Tansy. In: A Modern Herbal. (Editor Lye CF), Penguin Books Ltd: Middlesex, pp.789-790.
- Grzegorzczak -Karolak I, Kuźma Ł, Wysokińska H (2015). The effect of cytokinins on shoot proliferation, secondary metabolite production and antioxidant potential in shoot cultures of *Scutellaria alpina*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 122:699-708.
- Guenther E (1948) The essential oils, Vol. 1. Van Nostrand Co., New York, USA, pp. 774
- Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL (1998) High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J Agr Food Chem* 46:1887-1892.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95-108.
- Hammer K, Carson C (2011) Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: Lipids and essential oils as antimicrobial agents (Editor Thormar H). John Wiley & Sons Australia Ltd, United Kingdom, pp. 255-306.

- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 86:985-990.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (2002) *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J Antimicrob Chemoth* 50:195-199.
- Handford CE, Elliott CT, Campbell K (2015) A review of the global pesticide legislation and the scale of challenge in reaching the global harmonization of food safety standards. *Integ Environ Asses* 9999:1-12.
- Handley R, Ekbom B, Agren J (2005) Variation in trichome density and resistance against a specialist insect herbivore in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Ecol Entomol* 30:284-292.
- Haraguchi H, Ishikawa H, Mizutani K, Tamura Y, Kinoshita T (1998) Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. *Bioorgan Med Chem* 6:339-347.
- Harborne JB (1986) Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res* 213:15-24.
- Harborne JB (1993) Introduction to ecological biochemistry 4<sup>th</sup> edition. Academic Press, London.
- Harer JD, Elle E (2002) Variable impact of diverse insect herbivores on dimorphic *Datura wrightii*. *Ecology* 83:2711-2720.
- Harpaz S, Glatman L, Drabkin V, Gelman A (2003) Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of fresh water reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *J Food Protect* 66:410-417.
- Hartmann T (2007) From waste products to ecochemicals: Fifty years' research of plant secondary metabolism. *Phytochem* 68:2831-2846.
- Hartmans KJ, Diepenhorst P, Bakker W, Gorris LG (1995) The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. *Ind Crop Prod* 4:3-13.

- Haughton CS (1978) Green immigrants: The plants that transformed America. Harcourt, Brace, Jovanovich, New York, NY, USA. pp. 450.
- Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeut* 96:67-202.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW (2007) *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiol* 153:1677-1692.
- Hendriks H, van der Elst DJD, van Putten FMS, Bos R (1990) The essential oil of Dutch Tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *J Essent Oil Res* 2:155-162.
- Hernández I, Alegre L, Van Breusegem F, Munné-Bosch S (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends Plant Sci* 4:125-132.
- Hertel TW (2015) The challenges of sustainably feeding a growing planet. *Food Sec* 7:185-198.
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol* 45:115-120.
- Hethelyi E, Tetenyi P, Danos B, Koczka I (1991) Phytochemical and antimicrobial studies on the essential oils of the *Tanacetum vulgare* clones by gas chromatography/mass spectrometry. *Herba Hungarica* 30:82-90.
- Heywood VH (1976) *Tanacetum* L. In: *Flora Europaea, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)*, vol. 4. (Editors Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA). Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp.169-171.
- Hierro I, Valero A, Perez P, Gonzalez P, Cabo MM, Navarro MC (2004) Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* larvae. *Phytomedicine* 11:77-82.
- Hitmi A, Barthomeuf C, Coudret A (2000) The production of pyrethrins by plant cell and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35:317-337.



- Hoet S, Stévigny C, Hérent MF, Quetin-Leclercq J (2006) Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med* 72:480-482.
- Hold KM, Sirisoma NS, Ikeda T, Narahashi T, Casida JE (2000)  $\alpha$ -Thujone (the active component of absinthe):  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3826-3831.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez Diogenes AG, Nakamura CV (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 9:1027-1031.
- Holland TL, Arnold C, Fowler VG Jr (2014) Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. *JAMA* 312:1330-1341.
- Holopainen M (1989) A study on the essential oil of Tansy (*Tanacetum vulgare* L.). Ph.D. Thesis, Department of Pharmacy, University of Helsinki, Finland.
- Holopainen M, Kauppinen V (1989) Antimicrobial activity of different chemotypes of Finnish Tansy. *Planta Medica* 55:103.
- Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Wakada M, Nakanishi R, Nishino H, Matsui H, Sakai T (2005) Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells. *Oncogene* 24:7180-7189.
- Hossain MA, Bhattacharjee S, Armin SM, Qian P, Xin W, Li HY, Burritt DJ, Fujita M, Tran LS (2015) Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Front Plant Sci* 6:420.
- Hou DX, Luo D, Tanigawa S, Hashimoto F, Uto T, Masuzaki S, Fujii M, Sakata Y (2007) Prodelphinidin B-4 3'-O-gallate, a tea polyphenol, is involved in the inhibition of COX-2 and iNOS via the downregulation of TAK-1-NF- $\kappa$ B pathway. *Biochem Pharmacol* 74:742-751.
- Hough-Goldstein JA (1990) Antifeedant effects of common herbs on the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ Entomol* 19:234-238.
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem* 53:1841-1856.

- Hung TM, Na M, Thuong PT, Su ND, Sok D, Song KS, Seong YH, Bae K (2006) Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. J Ethnopharmacol 108:188-192.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front Microbiol 3:1-24.
- Imperato G, König B, Chiappe C (2007) Ionic green solvents from renewable resources. Eur J Org Chem 7:1049-1058.
- International Agency for Research of Cancer database <https://goo.gl/0z12g3> (Pristupljeno 1.5.2017)
- International Agency for Research of Cancer database <https://goo.gl/I9kDbJ> (Pristupljeno 7.5.2017)
- International Agency for Research of Cancer database <https://goo.gl/nezXWr> (Pristupljeno 25.5.2017)
- Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcuoglu M, Baser KH (2005) Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. Food Chem 93:551-556.
- Isman MB (2000) Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot 19:603-608.
- Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu Rev Entomol 51:45-66.
- Iwashina T (2000) The structure and distribution of the flavonoids in plants. J Plant Res 113:287-299.
- Jarlier V, INVS (2014) Surveillance of multidrug resistant bacteria in French healthcare facilities. BMR-Raisin Network Données 2012. Saint-Maurice: Institut de Veille Sanitaire (INVS). Available at: <http://invs.santepubliquefrance.fr/>
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA (2005) Modern food microbiology 7<sup>th</sup> edition. Springer Science + Business Media. New York, NY, USA

- Jensen WA (1962) Botanical histochemistry: principles and practice. W.H. Freeman & Co., San Francisco, USA. pp. 408.
- Jiang Z, Akhtar Y, Bradbury R, Zhang X, Isman MB (2009) Comparative toxicity of essential oils of *Litsea pungens* and *Litsea cubeba* and blends of their major constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. J Agric Food Chem 57:4833-4837.
- Johansen D (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill Publishing Company, Ltd., London, UK. pp.523 pp
- Jovanović S (1994) Ekološka studija ruderalne flore i vegetacije Beograda. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
- Jovanović S (1994) Ekološka studija ruderalne flore i vegetacije Beograda. - Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, pp. 222.
- Juan-Badaturuge M, Habtemariam S, Jackson C, Thomas MJK (2009) Antioxidant principles of *Tanacetum vulgare* L. aerial parts. Nat Prod Comm 4:1561-1564.
- Judzentiene A, Mockute D (2005) The inflorescence and leaf essential oils of *Tanacetum vulgare* L. var. *vulgare* growing wild in Lithuania. Biochem Sys Ecol 33:487-498.
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT (2009) Priming in systemic plant immunity. Science 324:89-91.
- Kaefer CM, Milner JA (2008) The role of herbs and spices in cancer prevention. J Nutr Biochem 19:347-361.
- Kähköänen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999) Antioxidant activity of plant extract containing phenolic compounds. J Agr Food Chem 47:3954-3962.
- Kale A, Gawande S, Kotwal S (2008) Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. Phytother Res 22:567-577.
- Kaleem S, Siddiqui S, Hussain A, Arshad M, Akhtar J, Rizvi A (2016) Eupalitin induces apoptosis in prostate carcinoma cells through ROS generation and increase of caspase-3 activity. Cell Biol Int 40:196-203.

- Kalembe D, Kunicka A (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 10:813-829.
- Kampa M, Nifli AP, Notas G, Castanas E (2007) Polyphenols and cancer cell growth. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 159:79-113.
- Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kouimtzooglou E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E (2003) Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research* 6:R63.
- Kang NJ, Shin SH, Lee HJ, Lee KW (2011) Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Therapeut* 130:310-324.
- Karban R, Baldwin I (1997) *Induced responses to herbivory*. University of Chicago Press, Chicago, USA. pp. 319.
- Karban R, Baldwin I, Baxter K, Laue G, Felton GW (2000) Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* 125:66-71.
- Karban R, Huntzinger M, McCall AC (2004) The specificity of eavesdropping on sagebrush by other plants. *Ecology* 85:1846-1852.
- Karban R, Maron J (2002) The fitness consequences of interspecific eavesdropping between plants. *Ecology* 83:1209-1213.
- Karban R, Shiojiri K, Huntzinger M, McCall AC (2006) Damage-induced resistance in sagebrush: volatiles are key to intra- and interplant communication. *Ecology* 87:922-930.
- Karimi M, Mohammad A, Shabani H, Tamaddon F, Azad D (2015) Deep eutectic liquid organic salt as a new solvent for liquid-phase microextraction and its application in ligandless extraction and preconcentration of lead and cadmium in edible oils. *Talanta* 144:648-654.
- Karlsen A, Retterstøl L, Laake P, Paur I, Kjølrsrud Bøhn S, Sandvik L, Blomhoff R (2007) Anthocyanin inhibits NF- $\kappa$ B transactivation and decreased plasma concentrations of

- proinflammatory chemokines, cytokines, and inflammatory mediators. *J Nutr* 137:1951-1954.
- Karpouhtsis I, Pardali E, Feggou E, Kokkini S, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P (1998) Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J Agr Food Chem* 6:1111-1115.
- 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.
- Katalinić V, Miloš M, Kulisić T, Jukić M (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* 94:550-557.
- Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S (2012) The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem* 20:5678-5698.
- Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaki Y, Anuurad E, Shiwaku K (2004) Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin–Ciocalteu assay. *J Agr Food Chem* 52:2391-2396.
- Katsuda Y (1999) Development and future prospects for pyrethroid chemistry. *Pestic Sci* 55:775-782.
- Katz T M, Miller JH, Hebert AA (2008) Insect repellents: Historical perspectives and new developments. *J Am Acad Dermatol* 58:865-871.
- Kawazu K, Mochizuki A, Sato Y, Sugeno W, Murata M, Seo S, Mitsuhashi I (2012) Different expression profiles of jasmonic acid and salicylic acid inducible genes in the tomato plant against herbivores with various feeding modes. *Arthropod-Plant Inter* 6:221-230.
- Kayano S, Kikuzaki H, Fukutsaka N, Mitani T, Nakatani N (2002) Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist. *J Agric Food Chem* 50:3708-3712.

- Keane S, Ryan MF (1999) Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochem Molec* 29:1097-1104.
- Kellogg EA (2001) Root hairs, trichomes and the evolution of duplicate genes. *Trends Plant Sci* 6:550-552.
- Kelsey RG, Reynolds GW, Rodriguez E (1984) The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: *Biology and Chemistry of Plant Trichomes* (Edited by Rodriguez E, Healy PL, Metha I). Plenum Press, New York, USA. pp. 187-241
- Keskitalo M, Kanerva T, Pehu E (1995) Development of *in vitro* procedures for regeneration of petiole and leaf explants and production of protoplast-derived callus in *Tanacetum vulgare* L. (Tansy). *Plant Cell Rep* 14:261-266.
- Keskitalo M, Pehu E, Simon JE (2001) Variation in volatile compounds from Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochem Syst Ecol* 29:267-285.
- Khodyrev VP, Teshebaeva ZA, Toktoraliyev BA, Bakhvalov SA (2010) Entomopathogenic microorganisms in the foci of the gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) in nut-fruit forests of the south of Kyrgyzstan. *Contemp Probl Eco* 3: 09-514.
- Khosravi R, Sendi JJ (2013) Effect of neem pesticide (achook) on midgut enzymatic activities and selected biochemical compounds in the hemolymph of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: *Pyralidae*). *J Plant Protect Res* 53:238-247.
- Kikuta Y, Ueda H, Takahashi M, Mitsumori T, Yamada G, Sakamori K, Takeda K, Furutani S, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Matsuda K (2012) Identification and characterization of a GDSL lipase-like protein that catalyzes the ester-forming reaction for pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium*— a new target for plant protection. *Plant J* 71:183-193.
- Kim DO, Jeong SW, Lee CY (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food chem* 81:321-326.

- Kim JH, Baek MH, Chung BY, Wi SG, Kim JS (2004) Alterations in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. *J Plant Bio* 47:314-321.
- King PJ, Robinson WE Jr (1998) Resistance to the anti-human immunodeficiency virus type 1 compound L-chicoric acid results from a single mutation at amino acid 140 of integrase. *J Virol* 72:8420-8424.
- Kiran SR, Devi PS (2007) Evaluation of mosquitocidal activity of essential oil and sesquiterpenes from leaves of *Chloroxylon swietenia* DC. *Parasitol Res* 101:413-418.
- Kišgeci J (2008) Lekovite i aromatične biljke. Partenon. Beograd.
- Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J (2006). Analysis of defensive responses activated by volatile allo-ocimene treatment in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem* 67:1520–1529.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J* 312:478- 481.
- Kojić M, Stamenković V, Jovanović D (1998) Lekovite biljke jugoistočne Srbije. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Kolker E, Özdemir V, Martens L, Hancock W, Anderson G, Anderson N, Aynacioglu S, Baranova A, Campagna SR, Chen R, Choiniere J, Dearth SP, Feng WC, Ferguson L, Fox G, Frishman D, Grossman R, Heath A, Higdon R, Hutz MH, Janko I, Jiang L, Joshi S, Kel A, Kemnitz JW, Kohane IS, Kolker N, Lancet D, Lee E, Li W, Lisitsa A, Llerena A, Macnealy-Koch C, Marshall JC, Masuzzo P, May A, Mias G, Monroe M, Montague E, Mooney S, Nesvizhskii A, Noronha S, Omenn G, Rajasimha H, Ramamoorthy P, Sheehan J, Smarr L, Smith CV, Smith T, Snyder M, Rapole S, Srivastava S, Stanberry L, Stewart E, Toppo S, Uetz P, Verheggen K, Voy BH, Warnich L, Wilhelm SW, Yandl G (2014) Toward more transparent and reproducible omics studies through a common metadata checklist and data publications. *OMICS* 18:10-14.

- Kost C, Heil M (2006) Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *J Ecol* 94:619-628.
- Kostić I, Petrović O, Milanović S, Popović Z, Stanković S, Todorović G, Kostić M (2013) Biological activity of essential oils of *Athamanta haynaldii* and *Myristica fragrans* to gypsy moth larvae. *Ind Crop Prod* 41:17-20.
- Kostić M, Popović Z, Brkić D, Milanović S, Sivčev I, Stanković S (2008) Larvicidal and antifeedant activity of some plant-derived compounds to *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). *Biores Technol* 99:7897-7901.
- Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E (2002) Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag Sci* 58:1101-1106.
- Koul O, Walia S, Dhaliwal GS (2008) Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic Int* 4:63-84.
- Kuete V (2010) Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A review. *Planta Med* 76:1479-1491.
- Kumar PA, Malik VS, Sharma RP (1996) Insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv Appl Microbiol* 42:1-43.
- Kumar PA, Sharma RP, Malik VS (1996) The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv Appl Microbiol* 42:1-43.
- Kumar V, Tyagi D (2013) Chemical composition and biological activities of essential oils of genus *Tanacetum* - a review. *J Pharmacogn Phytochem* 2:159-163.
- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 38:133-142.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 680. *Nature* 227:680-685.
- Lahlou M, Berrada R (2003) Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatised in Morocco. *Flav Frag J* 18:124-127.



- Lahlou S, Tahraoui A, Israili Z, Lyoussi B (2007) Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. *J Ethnopharmacol* 110:458-463.
- Lahlou S, Tangia KC, Lyoussia B, Morel N (2008) Vascular effects of *Tanacetum vulgare* L. leaf extract: In vitro pharmacological study. *J Ethnopharmacol* 120:98-102.
- Lala G, Malik M, Zhao C, He J, Kwon Y, Giusti MM, Magnuson BA (2006) Anthocyanin rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 54:84-93.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE (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.
- Lamiria A, Lhalouib S, Benjlalic B, Berradaa M (2001) Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crop Res* 71:9-15.
- Lampronti I, Saab AM, Gambari R (2006) Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int J Oncol* 29:989-995.
- Lange BM, Mahmoud SS, Wildung MR, Turner GW, Davis EM, Lange I, Baker RC, Boydston RA, Croteau RB (2011) Improving peppermint essential oil yield and composition by metabolic engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16944-16949.
- Lanigan RS, Yamarik TA (2002) Final report on the safety assessment of BHT (1). *Int J Toxicol* 2:19-94.
- Larocque N, Vincent C, Bélanger A, Bourassa JP (1999) Effects of Tansy essential oil from *Tanacetum vulgare* on biology of oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana*. *J Chem Ecol* 25:1319.
- Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D (2008) Plant phenolics-secondary metabolites with diverse functions. In: *Recent advances in polyphenol research Volume 1* (Editors Daayf F, Lattanzio V). Blackwell Publishing Ltd. pp.1-35.
- Lawrence BM (2000) Progress in essential oils: tansy oil. *Perfum Flavor* 25:33-47.
- Le Marchand (2002) Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Biomed Pharmacother* 56:296-301.

- Lee BK, Kim JH, Jung JW, Choi JW, Han ES, Lee SH, Ko KH, Ryu JH (2005) Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Toxicol Lett* 157:49–56.
- Lee EJ, Oh SY, Sung MK (2012) Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 50:4136-4143.
- Lesiak K, Koprowska K, Zalesna I, Nejc D, Duchler M, Czyz M (2010) Parthenolide, a sesquiterpene lactone from the medical herb feverfew, shows anticancer activity against human melanoma cells *in vitro*. *Melanoma Res* 20:21-34.
- LeStrange R (1977) *A History of Herbal Plants*. London: Angus & Robertson. ISBN 0-207-95645-6.
- Levine MM (1984) *Escherichia coli* infections. In: *Bacterial Vaccines* (Editor Germanier R). Academic Press, Orlando, FL, USA. pp. 187-235.
- Li Y, Li MY, Wang L, Jiang ZH, Li WY, Li H (2004) Induction of apoptosis of cultured hepatocarcinoma cell by essential oil of *Artemisia annua* L. *J Sichuan Univ Med Sci Ed* 35:337.
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18:100-127.
- Lis-Balcnin M, Ochocka RJ, Deans SG, Asztemborska M, Hart S (1999) Differences in bioactivity between the enantiomers of  $\alpha$ -pinene. *J Essential Oil Res* 11:393-397.
- Liu B, Wang H, Du Z, Li G, Ye H (2011) Metabolic engineering of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Rep* 30:689-694.
- Ljaljević-Grbić M, Stupar M, Vukojević J, Soković M, Mišić D, Grubišić D, Ristić, M (2008) Antifungal activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil. *J Serb Chem Soc* 73:961-965.
- Long C, Sauleau P, David B, Lavaud C, Cassabois V, Ausseil F, Massiot G (2003) Bioactive flavonoids of *Tanacetum parthenium* revisited. *Phytochem* 64:567-569.
- Loza-Tavera H (1999) Monoterpenes in essential oils. *Adv Exp Med Biol* 464:49-62.
- Luckner M (1972) *Secondary metabolism in plants and animals*. Academic Press, New York. USA

- Luckner M (1990) Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals, 3<sup>rd</sup> edition. G. Fischer, Jena, Germany
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J (2011) Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe Interact* 24:183-193.
- Mabey R (1996) *Flora Botanica. The definitive guide to wild flowers, plants and trees.* Sinclair-Stevenson, London.
- Madheswaran R, Balachandran C, Murali Manohar B (2004). Influence of dietary culture material containing aflatoxin and T2 toxin on certain serum biochemical constituents in Japanese quail. *Mycopath* 158:337-341.
- Maffei ME (2010) Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *S Afr J Bot* 76:612-631.
- Maffei M, Mucciarelli M, Scannerini S (1994) Essential oils from *Achillea* species of different geographic origin. *Biochem Syst Ecol* 22 679-687.
- Majdi M, Liu Q, Karimzadeh G, Malboobi MA, Beekwilder J, Cankar K, de Vos R, Todorović S, Simonović A, Bouwmeester H (2011) Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochem* 72:1739-1750.
- Malolepsza U (2005) Spatial and temporal variation of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in *o*-hydroxyethylrutin-treated tomato leaves inoculated with *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol* 54:317-324.
- Manabe A, Nakayama S, Sakamoto K (1987) Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. *J J Pharmacol* 44:77-84.
- Máñez S, Jiménez A, Villar A (1991) Volatiles of *Sideritis mugronensis* flower and leaf. *J Essent Oil Res* 3:395-397.
- Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur NA, Echard BW, Bagchi D, Preuss HG (2001) Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol Cell Biochem* 228:111-117.

- Manosroi J, Dhumtanom P, Manosroi A (2006) Antiproliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett* 235:114-120.
- Manzoor M, Durrani MJ, Jabeen R, Irfan S, Luqman A, Bibi S (2013) Medicinal folk remedies of vegetables. *International Journal of Basic and applied Sciences* 2:1-11.
- Mari M, Bertolini P, Pratella GC (2003) Non conventional methods for the control of post harvest pear diseases. *J Appl Microbiol* 94:761-766.
- Marković I, Norris DM, Cekić MJ (1996a) Some chemical bases for gypsy moth, *Lymantria dispar*, larval rejection of green ash, *Fraxinus pennsylvanica*, foliage as food. *Chem Ecol* 22:2283.
- Marković I, Norris DM, Phillips JK, Webster FX (1996b) Volatiles involved in the non-host rejection of *Fraxinus pennsylvanica* by the *Lymantria dispar* larvae. *J Agr Food Chem* 44:929-935.
- Martinez J, Silván AM, Abad MJ, Bermejo P, Villar A, Söllhuber M (1997) Isolation of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum* as PMA-induced ear edema inhibitors. *J Nat Prod* 60:142-144.
- Masood A, Iqbal NI, Khan NA (2012) Role of ethylene in alleviation of cadmium-induced photosynthetic capacity inhibition by sulphur in mustard. *Plant Cell Environ* 35:524-533.
- Mathema VB, Koh YS, Thakuri BC, Sillanpää M (2012) Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities. *Inflammation* 35: 560-565.
- Matthes MC, Bruce TJ, Ton J, Verrier PJ, Pickett JA, Napier JA (2010) The transcriptome of *cis*-jasmonate-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence. *Planta* 232:1163-1180.
- Maxia A, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L (2009) Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. *Fitoterapia* 80:57-61.

- McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *A J Med* 108:652-659.
- Mendoza-Yepes MJ, Sanchez-Hidalgo LE, Maertnes G, Marin-Iniesta FU (1997) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *J Food Safety* 17:47-55.
- Metcalf CR, Chalk L (1950) *Anatomy of Dicotyledons, Vols I and II*. Oxford: Clarendon Press. pp. 1500
- Miccadei S, Di Venere D, Cardinali A, Romano F, Durazzo A, Foddai MS, Fraioli R, Mobarhan, S, Maiani G (2008) Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutr Cancer* 60:276-283.
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52:673-751.
- Miguel G, Simoes M, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Carvalho L (2004) Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chem* 86:183-188.
- Miguel MG (2010) Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Frag J* 25:291-312.
- Mihajlović Lj (2008) Gubar (*Lymantria dispar* L.) (Lepidoptera, Lymantridae) u Srbiji. *Šumarstvo* 1-2:1-26.
- Mikulašová M, Vaverková Š (2009) Antimicrobial effects of essential oils from *Tanacetum vulgare* L. and *Salvia officinalis* L., growing in Slovakia. *Nova Biotechnol* 9:161-166.
- Milanović S (2011) Razviće gubara (*Lymantria dispar* L.) (Lepidoptera, Lymantriidae) na različitim vrstama hrastova u Srbiji. Doktorska disertacija, Šumarski fakultet, Univerzitet u Beogradu. pp.219
- Mills C, Cleary BJ, Gilmer JF, Walsh JJ (2004) Inhibition of acetylcholinesterase by tea tree oil. *J Pharm Pharmacol* 56:375-379.

- Milovanović D (2005) Atlas lekovitog bilja. Velarta, Beograd.
- Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem* 130:1036-1043.
- Mockute D, Judzentiene A (2004) Composition of the essential oils of *Tanacetum vulgare* L. growing wild in Vilnius district (Lithuania). *J Essent Oil Res* 16:550-553.
- Mohsenzadeh F, Chehregani A, Amiri H (2011) Chemical composition, antibacterial activity and cytotoxicity of essential oils of *Tanacetum parthenium* in different developmental stages. *Pharmaceut Biol* 49: 920–926.
- Mojzis J, Varinska L, Mojzisoava G, Kostova I, Mirossay L (2008) Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol Res* 57:259-265.
- Mok MC (1994) Cytokinins and plant development - An overview. In: Cytokinins – Chemistry, activity, and function (Editors Mok DWS, Mok MC). Boca Raton FL: CRC Press. pp.155-166.
- Molitor A, Zajic D, Voll LM, Pons-Kuhnemann J, Samans B, Kogel KH, Waller F (2011) Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and Piriformospora indica-mediated systemic induced resistance to powdery mildew. *Mol Plant Microb Interact* 24:1427-1439.
- Morais SM, Cavalcanti ES, Bertini LM, Oliveira CL, Rodrigues JR, Cardoso JH (2006) Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Croton species against *Aedes aegypti* L. *J Am Mosq Control Assoc* 22:161-164.
- Mordujovich-Buschiazzo P, Balsa EM, Buschiazzo HO, Mandrile E, Rosella M, Schinella G, Fioravanti D (1996) Anti-inflammatory activity of *Tanacetum vulgare*. *Fitoterapia* 67:319-322.
- Moretti MDL, Sanna-Passino G, Demontis S, Bazzoni E (2002) Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPS Pharm Sci Tech* 3:E13.
- Móricz MA, Häbe TT, Böszörményi A, Ott GP (2015) Tracking and identification of antibacterial components in the essential oil of *Tanacetum vulgare* L. by combination of high-performance thin-layer chromatography with direct bioautography and mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1422:310-317.

- Morse MA, Stoner GD (1993) Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* 14:1737-1746.
- Moteki H, Hibasami H, Yamada Y, Katsuzaki H, Imai K, Komiya T (2002) Specific induction of apoptosis by 1,8-cineole in two human leukemia cell lines, but not in a human stomach cancer cell line. *Oncol Rep* 9:757-760.
- Mothes K (1966) *Naturwissenschaften*, 53 p.317
- Mourey A, Canillac N (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13:289-92.
- Murakami A, Ashida H, Terao J (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 269:315-25.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nakamura A, Higuchi K, Goda H, Fujiwara MT, Sawa S, Koshihara T, Shimada Y, Yoshida S (2003) Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in *Arabidopsis*, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant physiol* 133:1843-53.
- Nano GM, Bicchi C, Frattini C, Gallino M (1979) Wild Piedmontese Plants II. A rare chemotype of *Tanacetum vulgare* L., abundant in Piedmont (Italy). *Planta Med* 35:270-274.
- Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR (2000) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharm* 33:2-16.
- Nardini M, Ghiselli A (2004) Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chem* 84:137-143.
- Naseri B, Fathipour Y, Moharramipour S, Hosseiniaveh V (2009) Life table parameters of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on different soybean cultivars. *J Entomol S Iran* 29:25-40.
- Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6:1451-1474.

- Negrín G, Rubio S, Marrero MT, Quintana J, Eiroa JL, Triana J, Estévez F (2015) The eudesmanolide tanapsin from *Tanacetum oshanahanii* and its acetate induce cell death in human tumor cells through a mechanism dependent on reactive oxygen species. *Phytomed* 22:385-393.
- Németh E, Héthelyi E, Bernath J (1994) Comparison studies on *Tanacetum vulgare* L. chemotypes. *J Herbs Spices Med Plants* 2:85-92.
- Nešković M, Konjević R, Čulafić Lj (2003) *Fiziologija biljaka*, NNK-International, Beograd.
- Neszmélyi A, Milne GWA, Héthelyi EA (1992) Composition of the essential oil of clone 409 of *Tanacetum vulgare* and 2D NMR investigation of *trans*-chrysanthenyl acetate. *J Essent Oil Res* 4:243-250.
- Neumann KH, Kumar A, Imani J (2009) *Plant cell and tissue culture – A tool in biotechnology. Basics and Application*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. pp. 293.
- Newman DJ, Cragg GM (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70:461-477.
- Nguyen T., Eshraghi J., Gonyea G., Ream R., Smith R. (2001) Studies on factors influencing stability and recovery of paclitaxel from suspension media and cultures of *Taxus cuspidata* cv *Densiformis* by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 911:55-61.
- Nijhout HF (1994) *Insect Hormones*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey, USA. pp. 260.
- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiol* 164:1636-1648.
- Noel JP, Austin MB, Bomati EK (2005) Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 8:249-253.
- Nori Shargh D, Norouzi-Arasi H, Mirza M, Jaimand K, Mohammadi S (1999) Chemical composition of the essential oil of *Tanacetum polycephalum* (sp. *heterophyllum*). *Flavour Fragr J* 14:105-106.



- Nottingham SF, Hardie J, Dawson GW, Hick AJ, Picett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM (1991) Behavioral and electrophysiological responses of aphids to host and nonhost plant volatiles. *J Chem Ecol* 17:1231-1242.
- Novgorodov SA, TI Gudz (1996) Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *J Bioenerg Biomembr* 28:139-146.
- Nowak M, Manderscheid R, Weigel HJ, Kleinwächter M, Selmar D (2010) Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. *J Appl Bot Food Qual* 8:133-136.
- Ogasawara M, Matsunaga T, Suzuki H (2007) Differential effects of antioxidants on the *in vitro* invasion, growth and lung metastasis of murine colon cancer cells. *Bio Pharm Bull* 30:200-204.
- Oksman-Caldentey KM, Inze D (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci* doi:10.1016/j.tplants.
- Olsen SJ, Bishop R, Brenner FW, Roels TH, Bean N, Tauxe RV, Slutské L (2001) The Changing Epidemiology of Salmonella: Trends in Serotypes Isolated from Humans in the United States, 1987-1997. *J Infect Dis* 183:753-161.
- Onozato T, Nakamura CV, Cortez DA, Filho BP, Ueda-Nakamura T (2009) *Tanacetum vulgare*: antiherpes virus activity of crude extract and the purified compound parthenolide. *Phytother Res* 23:791-796.
- Oussalah M, Caillet S, Lacroix M (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese innamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot* 69:1046-1055.
- Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Rita A, Duarte C (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21<sup>st</sup> Century. *ACS Sustainable Chem Eng* 2:1063-1071.

- Panasiuk O (1984) Response of Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), to volatile components of tansy, *Tanacetum vulgare*. J Chem Ecol 10:1325-1333.
- Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH (1997) Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. J Immunol Meth 208:151-158.
- Parada-Turska J, Paduch R, Majdan M, Kandefer-Szerszeń M, Rzeski W (2007) Antiproliferative activity of parthenolide against three human cancer cell lines and human umbilical vein endothelial cells. Pharmacol Rep 59:233-237.
- Pareek A, Suthar M, Rathore GS, Bansal V (2011) Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. Pharmacogn Rev 5:103-110.
- Park EH, Chang HH, Cha YN (1990) Induction of hepatic tumors with butylated hydroxyanisole in the selffertilizing hermaphroditic fish *Rivulus ocellatus marmoratus*. Jpn J Cancer Res 81:738-741.
- Paschold A, Halitschke R, Baldwin IT (2006) Using 'mute' plants to translate volatile signals. Plant J 45:275-291.
- Pastor V, Luna E, Ton J, Cerezo M, García-Agustín P, Flors V (2013) Fine tuning of reactive oxygen species homeostasis regulates primed immune responses in *Arabidopsis*. Mol Plant-Microbe Interact 26:1334-1344.
- Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri, P Newton TR, Rice S Gelfanov V, Boswell S H, Goulet RJ, Sledge GW, Nakshatri H (2000) Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. Oncogene 19:4159-4169.
- Pauli A (2006) Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. Med Res Rev 26:223-268.
- Pavela R (2005) Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. Fitoterapia 76:691-696.
- Peluso G, De Feo V, De Simone F, Bresciano E, Vuotto ML (1995) Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide anion production. J Nat Prod 58:639-646.

- Perez RP, Godwin AK, Handel LM, Hamilton TC (1993) A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 29A:395-399.
- Perry JA, Wang TL, Welham TJ, Gardner S, Pike JM, Yoshida S, Parniske MA (2003) TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 131:866-871.
- Pessoa LM, Morais SM, Bevilaqua CM, Luciano JH (2002) Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 109:59-63.
- Petrov VD, Van Breusegem F (2012) Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants* pls 014.
- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N (2006) Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 310:808-811.
- Pichersky E, Raguso RA, Lewinsohn E, Croteau R (1994) Floral scent production in *Clarkia* (Onagraceae). *Plant Physiol* 106:1533-1540.
- Pickman AK (1984) Antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Biochem Syst Ecol* 12:13-8.
- Pietta PG (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63:1035-1042.
- Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, Chessa M, Cerri R, Casanova J (2002) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavor Fragr J* 17:15-19.
- Polatoğlu K, Demirci F, Demirci B, Gören N, Can Başer KH (2010) Antibacterial activity and the variation of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. essential oils from Turkey. *J Oleo Sci* 59:177-184.
- Popov V, Ristić M, Gašić O, Sekulović D (2001) Varijabilnost etarskog ulja *Tanacetum vulgare*. *Lekovite sirovine* 20:45-50.
- Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P (2013) Intercontinental spread of OXA-48  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill* 18:20549.

- Powell W, Thomas E, Baird P, Lawrence A, Booth B, Harrower JW, McNicol R (1997) Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. *Heredity* 79:48-59.
- Pragadheesh VS, Saroj A, Yadav A, Chanotiya CS, Alam M, Samad A (2013) Chemical characterization and antifungal activity of *Cinnamomum camphora* essential oil. *Ind Crop Prod* 49:628-633.
- Price DN, Berry MS (2006) Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. *J Insect Physiol* 52:309-319.
- Puangraphant S, Berhow MA, Vermillion K, Potts G, Gonzalez de Mejia E (2011) Dicaffeoylquinic acids in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF  $\kappa$ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases 8 and -3 in human colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 55:1509-1522.
- Quarles W (1999) Grow pesto for your pests! *Comm Sense Pest Contr* 15:13-19.
- Quattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJP, Bégin A (1997) Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int J Food Microbiol* 37:155-162.
- Ramachandra Rao S, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20:101-153.
- Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM (2007) *Listeria* - review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 40:4-13.
- Ramirez AM, Stoopen G, Menzel TR, Gols R, Bouwmeester H (2012) Bidirectional secretions from glandular trichomes of pyrethrum enable immunization of seedlings. *Plant Cell* 10:4252-4265.
- Ramos S (2007) Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 18:427-442.
- Ramos S (2008) Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 52:507-526.

- Rani V, Raina SN (2000) Genetic Fidelity of Organized Meristem-Derived Micropropagated Plants: A Critical Reappraisal. *In Vitro Cell Dev-Pl* 36:319-330.
- Raspor M, Motyka V, Žižková E, Dobrev PI, Trávníčková A, Zdravković-Korać S, Simonović A, Ninković S, Dragičević I (2012) Cytokinin profiles of *AtCKX2* overexpressing potato plants and the impact of altered cytokinin homeostasis on tuberization *in vitro*. *J Plant Growth Reg* 31:460-470.
- Rateb MEM, El-Gendy ANAM, El-Hawary SS, El-Shamy AM (2007) Phytochemical and biological investigation of *Tanacetum parthenium* (L.) cultivated in Egypt. *J Med Plant Res* 90:21-27.
- Rates SM (2001) Plants as source of drugs. *Toxicon* 39:603-613.
- Ratra GS, Casida JE (2001) GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. *Toxicol Lett* 122:215-222.
- Rattan RS (2010) Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protect* 29:913-920.
- Raubenheimer D, Simpson SJ (1992) Analysis of covariance: an alternative to nutritional indices. *Entomol Exp Appl* 62:221-231.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* 56:3-12.
- Raut JS, Karuppayil SM (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crop Prod* 62:250-264.
- Ravishankar G A, Rajasekaran T, Sarma KS, Venkataraman LV (1989). Production of pyrethrins in cultured tissue of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). *Pyret Post* 17:66-69.
- Re L, Barocci S, Sonnino S, Mencarelli A, Vivani C, Paolucci G, Scarpantonio A, Rinaldi L, Mosca E (2000) Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacol Res* 42:177-82.

- Reddy KRN, Raghavender CR, Reddy BN, Salleh B (2010) Biological control of *Aspergillus flavus* growth and subsequent aflatoxin B<sub>1</sub> production in sorghum grains. *African J Biotechnol* 9:4247-4250.
- Reddy L, Odhav B, Bhoola KD (2003) Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther* 99:1-13.
- Reese JC (1983) Nutrient-allelochemical interactions in host plant resistance. In: *Plant resistance to insects* (Editor Hedlin PA). American Chemical Society, Washington DC, USA. pp. 231-244.
- Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R (2009) Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview; *Forsch Komplement Med* 16:79-90.
- Reynolds SE (1987) The cuticle, growth and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pestic Sc* 20:131-146.
- Rhoades DF (1983) Responses of alder and willow to attack by tent caterpillars and webworms: evidence for phenomonal sensitivity of willows. In: *Plant resistance to insects, Symposium Series 208* (Editor Hedin PA). American Chemical Society, Washington DC, pp. 55-68.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2:152-159.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med* 20:933-956.
- Ríos JL, Recio MC (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 100:80-84.
- Robinson WE Jr, Reinecke MG, Abdel-Malek S, Jia Q, Chow SA (1996) Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6326-6331.
- Robles C, Garzino S (2000) Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. *Phytochem* 53:71-75.
- Rodriguez-Concepcion M (2004) The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr Pharm Design* 10:2391-2400.

- Roff DA (2000) Trade-offs between growth and reproduction: an analysis of the quantitative genetic evidence. *J Evol Biol* 13:434-445.
- Rohloff J, Mordal R, Dragland S (2004) Chemotypical Variation of Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) from 40 Different Locations in Norway. *J Agr Food Chem* 52:1742-1748.
- Rontein D, Onillon S, Herbette G, Lesot A, Werck-Reichhart D, Sallaud C, Tissier A (2008) CYP725A4 from yew catalyzes complex structural rearrangement of taxa-4(5),11(12)-diene into the cyclic ether 5(12)-oxa-3(11)-cyclotaxane. *J Biol Chem* 283:6067-6075.
- Rosenthal GA, Jansen DH (1979) Herbivores, their Interaction with secondary plant metabolites. Academic Press, New York, USA. pp. 718.
- Rosenthal JP, Dirzo R (1997) Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: Evidence from maizes and wild relatives. *Evol Ecol* 11:337-355.
- Ross IA (2001) Medicinal Plants of the World. Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses, Volume 2, 1<sup>st</sup> edition. Humana press, Totowa, New Jersey, USA. pp. 435.
- Rosselli S, Bruno M, Raimondo FM, Spadaro V, Varol M, Koparal AT, Maggio A (2012) Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. *siculum*. *Molecules* 17: 8186-8195.
- Ruß C, König B (2012) Low melting mixtures in organic synthesis – an alternative to ionic liquids? *Green chem* 14:2969-2982.
- Ruther J, Fürstenau B (2005) Emission of herbivore-induced volatiles in absence of an herbivore-response of *Zea mays* to green leaf volatiles and terpenoids. *Z Naturforsch C* 60:743-756.
- Sá JM, Chong JL, Wellems TE (2011) Malaria drug resistance: new observations and developments. *Essays Biochem* 51:137-160.
- Saad NY, Muller CD, Lobstein A (2013) Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Frag J* 28:269-279.

- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induce oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177:67-80.
- Sallaud C, Rontein D, Onillon S, Jabès F, Duffé P, Giacalone C, Thoraval S, Escoffier C, Herbette G, Leonhardt N (2009) A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *Plant Cell* 21:301-317.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. pp. 1626.
- Santana-Rios G, Orner GA, Amantana A, Provost C, Wu SY, Dashwood RH (2001) Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay. *Mutation Research/Genetic Toxicol Environ Mut* 495:61-74.
- Santiesteban-López A, Palou E, López-Malo A (2007) Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. *J Appl Microbiol* 102:486-497.
- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS (2013) *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 62:10-24.
- Sarret G, Harada E, Choi Y, Isaure M, Geoffroy N, Fakra S, Markus MA, Birschwilks M, Clemens S, Manceau A (2006) Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiol* 141:1021-1034.
- Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Iinuma M, Tosa H, Ohkawa Y (1996) Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J Ethnopharm* 54:171-176.
- Sato M, Miyazaki T, Kambe F, Maeda K and Seo H (1997) Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the induction of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor in cultured human synovial cells. *J Rheumatol* 24:1680-1684.



- Scalia S, Giuffreda L, Pallado P (1999) Analytical and preparative supercritical fluid extraction of chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *J Pharm Biomed Anal* 21:549-558.
- Schaefer S, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Janzowski C (2006) Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res* 50:24-33.
- Scheerer WR (1984) Components of oil of Tansy (*Tanacetum vulgare*) that repel Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*). *J Nat Prod* 47:964-969.
- Schillmiller AL, Last RL, Pichersky E (2008) Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Plant J* 54:702-711.
- Schmutterer H (1985) Sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. Wiley-VCH; Weinheim, Germany.
- Schnittger A, Hulskamp M (2002) Trichome morphogenesis: a cell-cycle perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 357:823-826.
- Schwab B, Folkers U, Ilgenfritz H, Hulskamp M (2000) Trichome morphogenesis in Arabidopsis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 355:879-883.
- Seaman FC (1982) Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Bot Rev* 48:121-592.
- Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D (2006) Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *J Agric Food Chem* 54:9329-9339.
- Seo JY (2009) The effects of aromatherapy on stress and stress responses in adolescents. *J Korean Acad Nurs* 39:357-365.
- Serafini M, Jakszyn P, Luján-Barroso L, Agudo A, Bas Bueno-de-Mesquita H, van Duijnhoven FJ, Jenab M, Navarro C, Palli D, Boeing H, Wallström P, Regnér S, Numans ME, Carneiro F, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Morois S, Grioni S, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, Ramon Quirós J, Molina-Montes E,

- Huerta Castaño JM, Barricarte A, Amiano P, Khaw KT, Wareham N, Allen NE, Key TJ, Jeurnink SM, Peeters PH, Bamia C, Valanou E, Trichopoulou A, Kaaks R, Lukanova A, Bergmann MM, Lindkvist B, Stenling R, Johansson I, Dahm CC, Overvad K, Jensen M, Olsen A, Tjønneland A, Lund E, Rinaldi S, Michaud D, Mouw T, Riboli E, González CA (2012) Dietary total antioxidant capacity and gastric cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Int J Cancer* 131:544-554.
- Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK (2006) Structure - radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochem* 67:2058-2070.
- Shaaya E, Rafaeli A (2007) Essential oils as biorational insecticides potency. In: *Insecticides Design Using Advanced Technologies* (Editors Ishaaya I, Ralf N, Rami HA). Springer, Berlin, Heidelberg, Germany. pp.249-261.
- Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H (2005) Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem* 20:7749-7759.
- Shannag HK, Capinera JL, Freihat NM (2015) Effects of Neem-based insecticides on consumption and utilization of food in larvae of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Sci* 15:152.
- Sharma N, Trikha P, Athar M, Raisuddin S (2001) Inhibition of benzo[a]pyrene- and cyclophosphamide-induced mutagenicity by *Cinnamomum cassia*. *Mutat Res-Fund Mol M* 480-481:179-188.
- Sheikh AH, Badmi R, Jalmi SK, Wankhede DP, Singh P, Sinha AK (2013) Interaction between two rice mitogen activated protein kinases and its possible role in plant defense. *BMC Plant Biol* 13:121.
- Shulaev V, Silverman P, Raskin I (1997) Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385:718-721.
- Si W, Gong J, Tsao R, Zhou T, Yu H, Poppe C, Johnson R, Du Z (2006) Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J Appl Microbiol* 100:296-305.

- Sikorska MA, Matlawska IR, Glowniak KA, Zgorka GR (2000) Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in *Asclepias syriaca* L. Acta Pol Pharm 57:69-72.
- Silva NCC, Fernandes Júnior (2010) A Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 16:402-413.
- Singh J, Tiwari KN (2010) High-frequency in vitro multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L. – a valuable medicinal plant. Ind Crop Prod 32:534-538.
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticult 16:144-153.
- Skaltsa H, Verykokidou E, Harvala C, Karabourniotis G, Manetas Y (1994) UV-B protective potential and flavonoid content of leaf hairs of *Quercus ilex*. Phytochem 37:987-990.
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology 11:118-131.
- Skoog F, Miller CO (1965) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: Molecular and Cellular Aspects of Development (Editor Bell E). Harper and Row, New York, pp. 481-494.
- Slivova V, Zaloga G, DeMichele SJ, Mukerji P, Huang YS, Siddiqui R, Harvey K (2005) Green tea polyphenols modulate secretion of urokinase plasminogen activator (uPA) and inhibit invasive behavior of breast cancer cells. Nutr Res 52:66-73.
- Smith E, Abbott A, Ryder K (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and their applications. Chem Rev 114:11060-11082.
- Soderlund DM, Knipple DC (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochem Mol Biol 33:563-577.
- Sokolović M, Šimpraga B (2006) Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. Food Contr 17:733-740.

- Sousa A, Pereira M (2014) *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs - A Review. *Pathogens* 680-703.
- Srivastava P, Kumar P, Singh DK, Singh VK (2012) Biological properties of *Thuja orientalis* Linn. *Adv Life Sci* 2:17-20.
- Stalikas CD (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Science* 30:3268–3295.
- Stojakowska A, Kisiel W (1997) Production of parthenolide in organ cultures in feverfew. *Plant Cell Tiss Org Cult* 47:159-162.
- Stojičić D, Tošić S, Slavkovska V, Zlatković B, Budimir S, Janošević D, Uzelac B (2016) Glandular trichomes and essential oil characteristics of *in vitro* propagated *Micromeria pulegium* (Rochel) Benth. (Lamiaceae). *Planta* 244:393-404.
- Stojković MB, Mitić SS, Pavlović JL, Stojanović BT, Paunović DĐ (2014) Antioxidant potential of *Tanacetum vulgare* L. extracts. *Biologica nyssana* 5:47-51.
- Sugiyama M (1999) Organogenesis *in vitro*. *Curr Opin Plant Biol* 2:61-64.
- Sultana S, Hu H, Gao L, Mao J, Luo J, Jongsma MA, Wang C (2015) Molecular cloning and characterization of the trichome specific chrysanthemyl diphosphate/chrysanthemol synthase promoter from *Tanacetum cinerariifolium*. *Sci Hortic* 185:193-199.
- Svendsen AB, Verpoorte R (1983) Chromatography of alkaloids. *Journal of Chromatography Library*, 23A, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York
- Szczepanik M, Zawitowska B, Szumny A (2012) Insecticidal activities of *Thymus vulgaris* essential oil and its components (thymol and carvacrol) against larvae of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). *Allelopathy J* 30:129-142.
- Szolyga B, Genilka R, Szczepanik M, Szumny A (2014) Chemical composition and insecticidal activity of *Thuja occidentalis* and *Tanacetum vulgare* essential oils against larvae of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*. *Entomol Exp Appl* 151:1-10.

- Tabaković-Tošić M (2014) Suppression of gypsy moth population in mountain Avala (Republic of Serbia) by introduction of entomopathogenic fungus *Entomophaga maimaiga*. Доклади на Българската академия на науките 67, No 1.
- Takabayashi J, Dicke M (1996) Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trend Plant Sci* 1:109-113.
- Tamura H, Akioka T, Ueno K, Chujo T, Okazaki K, King PJ, Robinson WE Jr (2006) Anti-human immunodeficiency virus activity of 3,4,5-tricaffeoylquinic acid in cultured cells of lettuce leaves. *Mol Nutr Food Res* 50:396-400.
- Tanimura S, Kadomoto R, Tanaka T, Zhang YJ, Kouno I, Kohno M (2005) Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1306-1313.
- Tatefuji T, Izumi N, Ohta T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M (1996) Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol Pharm Bull* 19:966-970.
- Tateo F, Riva G (1991) Influence of the drying process on the quality of essential oils in *Artemisia absinthium*. *Mitt. Gebiete Levensm Hyg* 82:607-614.
- Taylor LP, Grotewold E (2005) Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol* 8(3):317-323.
- Teixeira B, Marques A, Neng NR, Nogueira JMF, Saraiva JA, Nunes ML (2013) Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind Crop Prod* 43:587-595.
- Tepe B, Sokmen A (2007) Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. *Biorese Technol* 98:3076-3079.
- Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Sokmen A (2006) Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem* 95:200-204.
- The Plant List (2013) Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org> (Pristupljeno 21.4.2017).

- Thomas O (1989) Phytochemistry of the leaf and flower oils of *Tanacetum cilicium*. Fitoterapia LX:131-137.
- Tian D, Tooker J, Peiffer M, Chung S, Felton GW (2012) Role of trichomes in defense against herbivores: Comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (*Solanum lycopersicum*). Planta 236:1053-1066.
- Tissier A (2012a) Glandular trichomes: What comes after expressed sequence tags? Plant J 70:51-68.
- Tissier A (2012b) Trichome specific expression: promoters and their applications. In: Transgenic plants – Advances and limitations. In Tech Open Access Company, Rijeka, Croatia pp. 353-378.
- Ton J, Mauch-Mani B (2004)  $\beta$ -Amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. Plant J 38:119-130.
- Traw MB, Dawson ET (2002) Differential induction of trichomes by three herbivores of black mustard. Oecologia 131:526-532.
- Trumble JT (2002) Caveat emptor: safety considerations for natural products used in arthropod control. Am Entomol 48:7-13.
- Tsoyi K, Park HB, Kim YM, Chung JI, Shin SC, Shim HJ, Lee WS, Seo HG, Lee JH, Chang KC i sar (2008) Protective effect of anthocyanins from black soybean seed coats on UVB-induced apoptotic cell death *in vitro* and *in vivo*. J Agric Food Chem 56:10600-10605.
- Tsuchiya H (2010) Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. Food Chem 120:1089-1096.
- Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M, Noguchi K, Ishiyama M, Ezoe T, Matsumoto K (2012) Comparison of WST-8 colorimetric method and CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against resistant bacteria. J Microbiol Meth 90:160-166.
- Tucakov J (1997) Lečenje biljem. Rad. Beograd.
- Tuni I, Sahinkaya S (1998) Sensitivity of two green house pests to vapours of essential oils. Entomol Exp Appl 86:183-187.

- Turner GW, Gershenzon J, Croteau RB (2000) Development of peltate glandular trichomes of Peppermint. *Plant Physiol* 124:665-680.
- Turner GW, Gershenzon J, Croteau RB (2000) Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiol* 124:655-663.
- Turtola S, Manninen AM, Rikala R, Kainulainen P (2003) Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. *J Chem Ecol* 29:1981-1995.
- Ujváry I (1999) Nicotine and other insecticidal alkaloids. In: *Nicotinoid insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor* (Editors Yamamoto I, Casida JE). Springer.
- Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 68:1561-1568.
- Valero-Aracama C, Kane M, Wilson S, Philman N (2010) Substitution of benzyladenine with metatopolin during shoot multiplication increases acclimatization of difficult and easy to acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. *Plant Growth Regul* 60:43-49.
- Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M (2012) Measurement of oxidative stress by EPR radical-probe technique. *Free Rad biol med* 31:708-716.
- Van de Braak SA, Leijten GC (1999) *Essential oils and oleoresins: A survey in the Netherlands and other major markets in the European Union*. CBI, Centre for the promotion of imports from developing countries, Rotterdam, The Netherland. pp.116.
- Van Schie CCN, Haring MA, Schuurink RC (2007) Tomato linalool synthase is induced in glandular trichomes by jasmonic acid. *Plant Mol Biol* 64:251-263.
- Van Staden J, Zazimalova E, George EF (2008) *Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists*. In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (Editors George EF, Hall MA, De Klerk GJ). Springer Netherlands, Volume 1, pp.205-226.

- van Wyk BE, Wink M (2004) Medicinal plants of the world: an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses Timber Press. Portland.
- Veach YK, Martin RC, Mok DWS, Malbeck J, Vaňková R, Mok MC (2003) O-Glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiol* 131:1374-1380.
- Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF (1997) The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* 17:43-52.
- Vergnes S, Ladouce N, Fournier S, Ferhout H, Attia F, Dumas B (2014) Foliar treatments with *Gaultheria procumbens* essential oil induce defense responses and resistance against a fungal pathogen in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 5:477.
- Vidya PR, Senthil MR, Maitreyi S, Ramalingam K, Karunagaran D, Nagini S (2010) The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- $\kappa$ B inhibition. *Eur J Pharmacol* 649:84-91.
- Vijaya K, Ananthan S (1996) Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. *Indian J Pharm Sci* 58:191-193.
- Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agr Food Chem* 49:5315-5321.
- Vinterhalter D, Vinterhalter B (1996) Kultura *in vitro* i mikropropagacija biljka. Axial, Beograd. pp. 131.
- Wagner C, Sefkow M, Kopka J (2003) Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. *Phytochem* 62:887-900.
- Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW (2004) New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Ann Bot* 93:3-11.
- Walia S, Saha S, Tripathi V, Sharma KK (2017) Phytochemical biopesticides: some recent developments. *Phytochem Rev* 1-19. doi:10.1007/s11101-017-9512-6.



- Wang W, Wang C, Ding XQ, Pan Y, Gu TT, Wang MX, Liu YL, Wang FM, Wang SJ, Kong LD (2013) Quercetin and allopurinol reduce liver thioredoxin interacting protein to alleviate inflammation and lipid accumulation in diabetic rats. *Brit J Pharmacol* 169:1352-137.
- Waterhouse AL (2002) Wine phenolics. *Ann NY Acad Sci* 957:21-36.
- Wegiera M, Smolarz HD, Druch MJ, Korczak M, Koproń K (2012) Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line-pilot study. *Acta Pol Pharm* 69:263-268.
- Wei A, Shibamoto T (2010) Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *J Agr Food Chem* 58:7218-7225.
- Wen J, You KR, Lee SY, Song CH, Kim DG (2002) Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *J Biol Chem* 277:38954-38964.
- Werbrouck SPO, van der Jeugt B, Dewitte W, Prinsen E, Van Onckelen HA, Debergh PC (1995) The metabolism of benzyladenine in *S. floribundum* Schott 'Petite' in relation to acclimatization problems. *Plant Cell Rep* 14:662-665.
- Werker E (2000) Trichome diversity and development. *Adv Bot Res* 31:1-35.
- Werner S, Maschke RW, Eibl D, Eibl R (2017) Bioreactor technology for sustainable production of plant cell-derived product. *Bioprocessing of plant in vitro systems*. Part of the series Reference Series in Phytochemistry pp.1-20.
- Wichtl M (2004) *Herbal drugs and phytopharmaceuticals*. MedPharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, Germany. pp. 708.
- Williams CA, Harborne JB, Eagles J (1999a) Variations in lipophilic and polar flavonoids in the genus *Tanacetum*. *Phytochem* 52:1301-1306.
- Williams CA, Harborne JB, Geiger H, Houlst JR, (1999b) The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochem* 51:417-423.
- Williams DH, Stone MJ, Hauck PR, Rahman SK (1989) Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod* 52:1189-1208.

- Wink M (1988) Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoret Appl Genetics* 75:225-233.
- Wink M (1999) Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary products. In: *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology* (Editor Wink M). CRC Press, Boca Raton, FL. pp 1-16.
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem* 64:3-19.
- Wink M (2010) Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. In: *Biochemistry of plant secondary metabolism*, 2<sup>nd</sup> Edition. *Ann Plant Rev* 40:1-19.
- Wink M, Alfermann AW, Franke R, Wetterauer B, Distl M, Windhövel J, Krohn O, Fuss E, Garden H, Mohagheghzadeh A, Wildi E, Ripplinger P (2005) Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents. *Plant Genet Res* 3:90-100.
- Wink M, Schimmer O (1999) Modes of action of defensive secondary metabolites. In: *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology* (Editor Wink M). CRC Press, Boca Raton, FL. pp 17-112.
- Wojdyło A, Oszmian J, Czemerys R (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 105:940-949.
- Wright JS, Johnson ER, Di Labio GA (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc* 123:1173-1183.
- Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior R L (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agr Food Chem* 52:4026-4037.
- Xie F, Lang Q, Zhou M, Zhang H, Zhang Z, Zhang Y, Wan B, Huang Q, Yu L (2012) The dietary flavonoid luteolin inhibits Aurora B kinase activity and blocks proliferation of cancer cells. *Eur J Pharm Sci* 46:388-396.

- Xie G, Schepetkin IA, Quinn MT (2007) Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L. *Int Immunopharmacol* 7:1639-1650.
- Xue L, Yongkang L, Huixing S, Juan Y (2011) Antioxidant activities and functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) protein hydrolysates. *J Sci Food Agricult* 92:292-298.
- Yalpani N, Leon J, Lawton MA, Raskin I (1993) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Plant Physiol* 103:315-321.
- Yang P, Ma Y (2005) Repellent effect of plant essential oils on *Aedes albopictus*. *J Vector Ecol* 30:231-234.
- Yoo CB, Han KT, Cho KS, Ha J, Park HJ, Nam JH, Kil UH, Lee KT (2005) Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett* 225:41-52.
- Yoon HS, Moon SC, Kim ND, Park BS, Jeong MH, Yoo YH (2000) Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Bioch Bioph Res Co* 276:151-156.
- Yung J, Lee H, Ko H J, Woo E R, Lee DG (2015) Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. *Biochim Biophys Acta* 1848:695-701.
- Zdero C, Bohlmann F (1990) Sesquiterpene lactones from *Dicoma* species. *Phytochem* 29:183-187.
- Zebelo SA, Matsui K, Ozawa R, Maffei ME (2012) Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (*Solanum lycopersicon*) plant-to-plant communication. *Plant Sci* 196:93-100.
- Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D (2008) Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J Agric FoodChem* 56:670-675.
- Zheng W, Wang SY (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 49:5165-5170.

- Zhu K, Cordeiro M, Atienza J (1999) Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. *J Virol* 73:3309-3316.
- Zibae A, Bandani AR (2010) Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on the digestive enzymatic profiles and the cellular immune reactions of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauveria bassiana*. *Bull Entomol Re* 100:185-96.
- Zimdahl RL (1989) *Weeds and Words*. Iowa State University Press, Ames. p 125.
- Zimmerli L, Jakab G, Métraux J-P, Mauch-Mani B (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by  $\beta$ -aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12920-12925.
- Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM (2011b) Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomed* 18:1181-1190.
- Zore GB, Thakre AD, Rathod V, Karuppayil SM (2011a) Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. *Mycoses* 54:99-109.
- Zuzarte MR, Dinis AM, Cavaleiro C, Salgueiro LR, Canhoto JM (2010) Trichomes essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Ind Crop Prod* 32:580-587.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Nina M. Devrnja rođena je 18. januara 1979. godine u Zadru. Osnovnu školu je završila u Benkovcu a X gimnaziju u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1997. godine na studijskoj grupi Biologija, gde je diplomirala 2008. godine. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2011. godine u okviru studijskog programa Fiziologija i molekularna biologija biljaka. Od aprila 2012. godine Nina Devrnja zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je juna 2012. godine.

U toku svog naučno-istraživačkog rada Nina Devrnja učestvovala je u realizaciji nacionalno projekata: "Biotehnologija *in vitro* – gajene, lekovite i ugrožene biljne vrste" (br. ON173015, u periodu od 2011. do danas).

Nina Devrnja je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS) i Federacije evropskih udruženja za biologiju biljaka (The Federation of European Societies of Plant Biology – FESPB).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Нина М. Деврња \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_ Б3007/2011 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

In vitro пропaгација и биолошка активност етарског уља и метанолних екстраката  
повратича (*Tanacetum vulgare* L.)

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 10.7.2017. \_\_\_\_\_

 \_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Нина М. Деврња \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_ Б3007/2011 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Физиологија и молекуларна биологија биљака \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ *In vitro* пропaгација и биолошка активност етарског уља  
и метанолних екстраката повратича (*Tanacetum vulgare* L)

Ментор \_\_\_\_\_ др Душица Ћалић \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ Нина М. Деврња \_\_\_\_\_

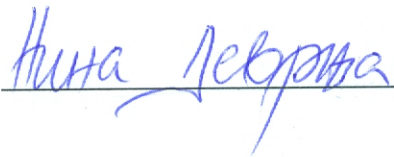
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 10.7.2017. \_\_\_\_\_

 \_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

In vitro пропaгација и биолошка активност етарског уља и метанолних екстраката  
повратича (*Tanacetum vulgare* L.)

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 10.7.2017. \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_