УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Драгана М. Божић

ИЗОЛАЦИЈА И ФУНКЦИОНАЛНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ГЕНА УКЉУЧЕНИХ У СИНТЕЗУ КАРНОЗИНСКЕ КИСЕЛИНЕ

докторска дисертација

Београд, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Dragana M. Božić

ISOLATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE GENES INVOLVED IN THE SYNTHESIS OF CARNOSIC ACID

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Ментори:

др Анета Сабовљевић, доцент

Биолошки факултет

Универзитет у Београду

др Ангелос Канелис, редовни професор

Фармацеутски факултет

Аристотелов универзитет у Солуну, Грчка

Чланови комисије:

др Данијела Мишић, научни сарадник

Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,

Универзитет у Београду

Датум одбране:

Експериментални део докторске дисертације урађен је у оквиру пројекта Plant Terpenoids for Human Health: a chemical and genomic approach to identify and produce bioactive compounds (FP7 пројекат, бр. 227448), у Лабораторији за фармакогнозију Фармацеутског факултета Аристотеловог универзитета у Солуну, Грчка.

Захваљујем се својим менторима, а посебно др Ангелосу Канелису, на пруженој прилици и указаном поверењу. Труд који је уложио, мудре идеје и велико искуство били су од пресудног значаја за израду ове дисертације[1]. Велику захвалност дугујем и др Данијели Мишић, чија ми је помоћ, у виду корисних савета и сугестија, била од изузетног значаја. Иако физички далеко, увек је била спремна да несебично подели своје знање и искуство, али и да пружи тако важне речи охрабрења. Захваљујем се и свом ментору др Анети Сабовљевић, на помоћи и подршци, не само током израде ове дисертације, већ и током читавог трајања докторских студија.

Захвалност дугујем и запосленима на Институту за примењене бионауке из Солуна, а нарочито др Антониосу Макрису, на помоћи, пренешеном знању, упознавању са техникама молекуларне биологије, и на обезбеђивању неопходног материјала за рад са културама квасца[2].

Од пресудног значаја била је и помоћ др Сотириоса Кампраниса, коме сам изузетно захвална због тога што ме је великодушно примио у своју лабораторију, али и због пружене стручне помоћи и времена које је посветио решавању проблема са којима сам се сусрела током експерименталног рада. Такође, велико хвала дугујем и др Кодруци Игнеи, на стрпљењу и уложеном труду. Захвална сам и Стефаносу Костасу на несебичној помоћи[3].

Захваљујем се и др Константиносу Тсолеридису на стручној помоћи у виду извођења NMR спектроскопских испитивања, и Мр Елени Димитриаду, на помоћи приликом припреме материјала за анализу[4].

Такође, захвалност дугујем и свим партнерима на пројекту, а посебно др Алану Тисијеу на несебичној помоћи у виду конструката за екперимете

[1] *I thank my mentors, especially dr Angelos Kanellis, for giving me the opportunity and putting his trust in me. The effort he has invested, his wise ideas, and broad experience, were of immense significance for completing this dissertation.*

[2] *I owe my gratitude to the members of the Institute of Applied Biosciences from Thessaloniki, especially to dr Antonios Makris, for all the help, the knowledge he has passed on to me, for introducing me to molecular biology techniques, and fro providing the material necessary for working with yeast.*

[3] *Of crucial importance was also the help of dr Sotirios Kampranis, to whom I am very grateful for generously accepting me in his lab, for providing his expert assistance and for the time he has dedicated to solving the problems I have encountered during my experimental work. I owe a big thanks to dr Codruta Ignea, for her patience and the effort invested. I am also thankful to Stefanos Kostas, for his selfless help.*

[4] *I thank dr Konstantinos Tsoleridis for his expert assistance he has given by performing the NMR spectroscopic investigation, and to Mr Eleni Dimitriadou, for her help preparing the material for the analysis.*

карактеризације функције гена, и др Рику де Восу на изведеним LC-MS анализама[5].

Велику подршку пружили су ми сви чланови Лабораторије за фармакогнозију Фармацеутског факултета из Солуна. Посебно значајни били су ведар дух, бодрење и помоћ коју су пружиле мр Антигони Папаниколау и мр Анастасиа Сарамуртси. Захваљујем се и др Димитри Папаефитимиу на помоћи, корисним саветима и мотивишућим разговорима. Захвалност дугујем и Ериети Терзи, због сарадње у експерименталном делу рада, и због позитивне енргије коју је увек уносила у лабораторију. Велико хвала и осталим члановима Фармацеутског факултета из Солуна, а посебно мр Елси Аманатиаду и мр Ирини Каната на помоћи, разумевању, и несебичној подршци[6].

Захваљујем се свим својим колегама са одељења за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић". Упркос великој удаљености, увек сам осећала да су уз мене. Захваљујем се и др Златку Гиби, на знању које ми је пренео, подршци и оптимизму. Посебну захвалност дугујем и др Драгољубу Грубишићу на указаном поверењу. Веома сам поносна што сам га познавала.

Хвала пуно и мојим макама, Кући и Јовани, које су увек биле уз мене, спремне да ме саслушају и охрабре, као и др Тањи Аднађевић, на мотивацији коју је увек била спремна да пружи.

На крају, велико хвала и мојим родитељима и сестри. Подразумева се да ништа од овог не би било могуће без њихове неизмерне љубави и стрпљења. Јована, због твоје енергије, ентузијазма и снаге, увек ћеш бити мој највећи узор.

За Анђу, Митра и Гаврила...

[5] I also owe my gratitude to all the project partners, especially to dr Alan Tissier, who has provided the constructs for the gene function characterization experiments, and to dr Ric de Vos, for performing the LC-MS analysis.

[6] All the members of the Laboratory of Pharmacognosy of the School of Pharmacy, Thessaloniki have been a source of great support to me. Cheerful spirit, encouragement and the help given by Mr Antigoni Papanikolaou and Mr Anastasia Saramourtsi were of extraordinary significance. I thank also Dr Dimitra Papaeftimiou for her assistance, useful advices, and motivating talks. I owe my gratitude to Erieta Terzi as well, for her cooperation on the experimental part of the work and the positive energy she kept bringing to the lab. Big thanks to all the other members of the School of Pharmacy, especially to Mr Elsa Amanatiadou and Mr Eirini Kanata for their help, understanding, and selfless support.

Изолација и функционална карактеризација гена укључених у синтезу карнозинске киселине

Резиме

Карнозинска киселина, фенолни дитерпен, поседује бројне биолошке активности због чега је потенцијално веома значајна за фармацеутску индустрију. Грчка жалфија (*Salvia fruticosa* Mill.) и рузмарин (*Rosmarinus officinalis* L.) богати су природни извори овог једињења. Иако је много тога познато у вези структуре и биолошких активности карнозинске киселине, веома мало се не зна о њеном биосинтетском путу у биљкама. Основни циљ дисертације био је изучавање биосинтезе карнозинске киселине на молекуларном нивоу, изолацијом и функционалном карактеризацијом гена укључених у овај процес. У ту сврху, извршена је анализа постојеће цДНК библиотеке жлезданих длака грчке жалфије, што је за резултат имало идентификацију два гена, названих *SfCPS* и *SfKSL*, који потенцијално кодирају дитерпен синтазе. Гени кандидати су изоловани и функционално окарактерисани у бактерији *Escherichia coli* Mig., квасцима (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen) и дувану (*Nicotiana benthamiana* Domin). Хетеролога екпресија гена *SfCPS* и *SfKSL* резултирала је синтезом милтирадиена, што је утврђено *GC-MS* анализом и *1D* и *2D* NMR спектроскопијом (^{1}H, ^{13}C, *DEPT*, *COSY H-H*, *HMQC* и *HMBC*). За проналажење преосталих гена одговорних за биосинтезу карнозинске киселине, обављено је секвенционирање транскриптома грчке жалфије и рузмарина, уз коришћење *454 GS FLX Titanium* платформе. На основу резултата фитохемијске анализе *LC-PDA-LTQ-Orbitrap FTMS* методом, жлездане длаке

младих листова благо стресираних биљака генотипа “Кавуси” грчке жалфије и жлездане длаке млађих стадијума развоја комерцијалног генотипа рузмарина (*B & T World Seeds*) изабране су као биљни материјал за анализу транскриптома. Резултат секвенционирања био је анотација великог броја нових секвенци, а посебно значајна била је идентификација гена метаболичких путева повезаних са секундарним метаболизмом. Изоловано је укупно 24 гена који су кодирали за ензиме фамилије цитохром *P450* (*CYP*) монооксигеназе. Функција ензима CYP76Sf2 грчке жалфије, и CYP76R03 и CYP76R04 рузмарина, као феругинол синтаза, утврђена је есејима функционалне карактеризације у квасцима и дувану. Клонирање и функционална карактеризација гена који својом заједничком активношћу доводе до синтезе феругинола код грчке жалфије и рузмарина, пружа основу будућим истраживањима биосинтетског пута карнозинске киселине. Уз то, извршена је локализација биосинтетског пута карнозинске киселине у жлезданим длакама грчке жалфије и рузмарина. Приложени резултати доприносе бољем разумевању метаболизма карнозинске киселине, и тиме омогућавају примену најсавременијих биотехнолошких метода за производњу овог фармацеутски значајног једињења.

Кључне речи: *Salvia fruticosa*, *Rosmarinus officinalis*, карнозинска киселина, милтирадиен, феругинол, фенолни дитерпени, карактеризација гена, дитерпен синтазе, цитохром *P450* монооксигеназе

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Физиологија биљака

УДК број: 577.2:581.192(043.3)

Isolation and functional characterization of the genes involved in the synthesis of carnosic acid

Summary

Carnosic acid is a phenolic diterpene potentially highly significant for the pharmaceutical industry, due to its numerous biological activities. Cretan sage (*Salvia fruticosa* Mill.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) are rich natural sources of this compound. Although the structure and biological activities of carnosic acid are widely known, its biosynthetic pathway in plants remains unexplored. The main aim of the dissertation was to investigate the carnosic acid biosynthesis at the molecular level, by isolating and functionally characterizing the genes involved in this process. For that purpose, the existing Cretan sage trichome cDNA library has been analyzed, which has resulted in the identification of two putative diterpene synthase genes, named *SfCPS* and *SfKSL*. The candidate genes were isolated and functionally characterized in *Escherichia coli* Mig., yeast (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen) and *Nicotiana benthamiana* Domin. Heterologous expression of *SfCPS* and *SfKSL* genes has resulted in the synthesis of miltiradiene, which has been confirmed by *GC-MS* analysis and *1D* and *2D* NMR spectroscopy (^{1}H, ^{13}C, *DEPT*, *COSY H-H*, *HMQC* и *HMBC*). In order to retrieve the remaining genes responsible for the biosynthesis of carnosic acid, the glandular trichomes of Cretan sage and Rosemary have been sequenced using *454 GS FLX Titanium* platform. Based on the results of the LC-PDA-LTQ-Orbitrap FTMS phytochemical analysis, glandular trichomes of Cretan sage young leaves (genotype Kavoussi) exposed to mild stress, and glandular trichomes on the Rosemary leaves of the younger developmental stage (commercial genotype B&T

World Seeds), were chosen for the transcriptome analysis.The sequencing has resulted in the annotation of a large number of new sequences. The identification of the genes belonging to the secondary metabolism pathways was especially significant. A total of 24 genes coding for cytochrome P450 monooxygenases was isolated. Using the functional characterisation assays in yeast and *Nicotiana benthamiana* it has been determined that the Cretan sage enzyme CYP76Sf2 and Rosemary enzymes CYP76R03 and CYP76R04 have the activity of ferruginol synthases. Molecular cloning and functional characterization of the genes that play a role in the synthesis of ferruginol in Cretan sage and Rosemary, forms a basis for the future investigation of the carnosic acid biosynthetic pathway. Additionaly, this pathway has been localized in the glandular trichomes of Cretan sage and Rosemary. The results of this dissertation help better understanding of the carnosic acid metabolism, which make production of this pharmaceutically valuable compound possible, using the advanced biotechnological methods.

Key words: *Salvia fruticosa*, *Rosmarinus officinalis*, carnosic acid, miltiradiene, ferruginol, phenolic diterpenes, gene characterization, diterpene synthases, cytochrome P450 monooxygenases

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant physiology

UDC number: 577.2:581.192(043.3)

Садржај

1. Увод 1

1.1. Секундарни метаболизам биљака 2

1.2. Терпени 3

1.3. Синтеза терпена 5

1.3.1. Мевалонатни биосинтетски (*MVA*) пут 7

1.3.2. Метилеритритол-фосфатни (*MEP*) пут 7

1.3.3. Склапање *C5* градивних блокова у *C10*, *C15* и *C20* пренил дифосфате 9

1.3.4. Изградња основних карбонилних скелета 11

1.3.5. Секундарне трансформације терпена 14

1.3.5.1. Цитохром *P450* монооксигеназе 14

1.4. Жлездане длаке као места синтезе и складиштења секундарних метаболита 16

1.5. Секундарни метаболити биљака породице Lamiaceae, са освртом на родове *Salvia* и *Rosmarinus* 18

1.5.1. *Salvia fruticosa* 19

1.5.2. *Rosmarinus officinalis* 22

1.6. Карнозинска киселина — карактеристике и могући кораци у биосинтетском путу 25

1.7. Улога *EST* секвенционирања у изолацији гена секундарног метаболизма 31

1.8. Карактеризација функције гена 34

2. Циљ рада..... 38

3. Материјал и методе 40

3.1. Биљни материјал 41

3.2. Изолација жлезданих длака..... 41

3.3. Изолација РНК из жлезданих длака 43

3.4. Електрофоретске технике.....43

3.4.1. Агарозни гел 43

3.4.2. *SDS*-гел електрофореза (*SDS*) 44

3.5. *PCR* амплификација 45

3.6. *TA* клонирање.....46

3.7. Клонирање засновано на рестрикционим ензимима 46

3.8. Пречишћавање из агарозног гела 48

3.9. Спајање вектора и фрагмента ДНК 48

3.10. Трансформација бактерија Escherichia coli 49

3.11. Изолација плазмида из бактерија 50

3.12. Хранљиве подлоге 50

3.14. Изолација и функционална карактеризација гена 51

3.14.1. Експресиони вектори..... 51

3.14.2. Клонирање гена..... 55

3.14.2.1. Клонирање цДНК потенцијалне терпен синтазе *SfCPS*.....56

3.14.2.2. Клонирање цДНК потенцијалне терпен синтазе *SfKSL*.....59

3.14.2.3. Клонирање цДНК потенцијалних цитохрома *P450*..... 61

3.14.3. Конструисање вектора за експресију у квасцима за гене *RoCPS* и *RoKSL1* 63

3.14.4. Функционална карактеризација гена хетерологом експресијом 68

3.14.4.1. Функционална карактеризација потенцијалних терпен синтаза SfCPS и SfKSL у бактерији E. coli 69

3.14.4.2. Функционална карактеризација гена у квасцима 72

3.14.4.2.1. Трансформација квасаца 72

3.14.4.2.2. Конструисање сојева 72

3.14.4.2.3. Експресија гена у квасцима 73

3.14.4.3. Есеј привремене експресије у врсти *Nicotiana benthamiana* 75

3.14.4.3.1. Припрема компетентних ћелија *Agrobacterium tumefaciens* и њихова трансформација 75

3.14.4.3.2. Агроинфилтрација 76

3.15. Инструменталне методе хемијске анализе 77

3.15.1. Гасна хроматографија-масена спектрометрија (*GC-MS*) 77

3.15.1.1. Микроекстракција у чврстој фази (*SPME*) 78

3.15.2. *NMR* анализа производа истовремене активности ензима SfCPS и SfKSL 78

3.15.3. LC-MS анализа фенолних дитерпена 80

3.16. Филогенетске и анализе аминокиселинских и нуклеотидних секвенци 81

3.17. Секвенцирање нове генерације и анализа транскриптома 81

4. Резултати 83

4.1. Изолација и функционална карактеризација терпен синтаза грчке жалфије и рузмарина укључених у синтезу милтирадиена 84

4.1.1. Изолација пуне дужине цДНК гена *SfCPS* који кодира копалил дифосфат синтазу биљке *Salvia fruticosa* 84

4.1.2. Изолација пуне дужине цДНК гена *SfKSL* који кодира милтирадиен синтазу биљке *Salvia fruticosa*.....86

4.1.3. Филогенетска анализа гена *SfCPS* и *SfKSL*.....87

4.1.4. Функционална карактеризација гена *SfCPS* и *SfKSL* 91

4.1.5. Функционална in vitro карактеризација гена *SfCPS* експримираног у бактерији *Escherichia coli*..... 91

4.1.6. Функционална карактеризација гена *SfKSL* 96

4.1.7. Функционална in vitro карактеризација гена *SfKSL* експримираног у бактерији Escherichia coli 96

4.1.8. Функционална карактеризација гена *SfKSL* у квасцима (*Saccharomyces cerevisiae*).....98

4.1.9. Функционална карактеризација гена *SfKSL* есејом привремене експресије у врсти *Nicotiana benthamiana*.....98

4.1.10. Карактеризација производа ензимске активности протеина SfKSL помоћу *NMR* спектроскопије.....99

4.1.11. Функционална карактеризација дитерпен синтаза рузмарина.....101

4.2. Анализа транскриптома жлезданих длака грчке жалфије и рузмарина уз помоћ 454 секвенционирања 102

4.2.1. Одабир биљног материјала 102

4.2.2. Изолација жлезданих длака и укупне РНК..... 104

4.2.3. Секвенцирање, повезивање фрагмената и идентификација гена потенцијално укључених у синтезу карнозичне киселине 107

4.2.3.1. Функционална анализа асемблираних секвенци 107

4.2.3.2. Функционална анализа асемблираних секвенци грчке жалфије... 108

4.2.3.3. Функционална анализа асемблираних секвенци рузмарина 112

4.2.3.2. Идентификација гена кандидата за синтезу карнозинске киселине 116

4.3. Изолација и функционална карактеризација цитохрома *P450* грчке жалфије и рузмарина потенцијално укључених у синтезу карнозичне киселине..... 117

4.3.1. Изолација и анализа секвенци цитохрома *P450* грчке жалфије..... 117

4.3.2. Изолација и анализа секвенци цитохрома *P450* рузмарина 122

4.3.3. Филогенетска анализа изолованих цитохрома *P450* 124

4.3.4. Функционална карактеризација изолованих цитохрома *P450* 126

4.3.4.1. Функционална карактеризација феругинол синтаза грчке жалфије и рузмарина у квасцима 126

4.3.4.2. Функционална карактеризација изолованих цитохром *P450* монооксигеназа привременом експресијом у дувану (*Nicotiana benthamiana*) 127

4.3.4.2.1. Функционална карактеризација феругинол синтаза у дувану (*Nicotiana benthamiana*) 127

4.3.4.2.2. Испитивање активности CYP71 кандидата у дувану (*Nicotiana benthamiana*) 129

5. Дискусија 131

5.1. SfCPS катализује синтезу копалил дифосфата..... 134

5.2. SfKSL као синтаза милтирадиена 136

5.3. Идентификација нових гена кандидата уз помоћ 454 секвенционирања..... 139

5.3.1. Биљни материјал..... 139

5.3.2. Анализа транскриптома и одабир гена кандидата 143

5.3.3. Карактеризација гена и идентификација феругинол синтаза 145

5.3.3.1. Синтеза милтирадиена активношћу дитерпен синтаза рузмарина у квасцима 145

5.3.3.2. Цитохром *P450* кандидати и карактеризација феругинол синтаза грчке жалфије и рузмарина..... 146

5.3.3.3. Активност ензима CYP71 фамилије..... 150

5.3.3.4. Допринос резултата докторске дисертације познавању биосинтетског пута карнозинске киселине 151

6. Закључци 155

7. Литература 158

8. Прилог 202

Биографија аутора 217

Прилог 1 — Изјава о ауторству

Прилог 2 — Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Прилог 3 — Изјава о коришћењу

1
Увод

1.1. Секундарни метаболизам биљака

Код биљака, метаболизам се може поделити на примарни и секундарни. **Примарни метаболизам** омогућава биљкама да користе воду, угљен диоксид и минералне материје за синтезу примарних метаболита као што су шећери, масне киселине, амино киселине и нуклеинске киселине, који су неопходни за формирање и одржавање биљних ћелија. Ова једињења су еволутивно веома стара и гени који су укључени у њихову синтезу у великој мери су конзервирани код свих познатих биљних врста. **Секундарним метаболитима** сматрају се једињења неопходна за интеракцију биљке са средином која је окружује. Секундарни метаболити, који се називају још и природни производи, фитохемикалије или специјализовани метаболити, јесу између осталог једињења за одбрану од штеточина и патогена и једињења за заштиту од штетног ултраљубичастог зрачења. Такође, секундарни метаболити често имају улогу атрактаната како за опрашиваче тако и за животиње које омогућавају разношење семена. Мутанти биљака, који немају способност производње одређених секундарних метаболита, често не успевају да преживе у природном окружењу. Смањени фитнес оваквих генотипова утиче на њихово изумирање у компетицији са биљкама дивљег типа (Züst и сар., 2011). Све ово јасно указује на велики еколошки значај секундарног метаболизма и може га сврстати у исту раван са примарним метаболизмом када је у питању њихов значај за преживљавање и успешност одређених биљних врста у природном окружењу. Са друге стране, секундарни метаболизам биљака изузетно је значајан и из перспективе човека, са обзиром на то да његови продукти утичу на арому и укус воћа и поврћа, а посредно утичу на здравље и пружају основу за многа фармацеутска једињења. До сада је познато више од 200.000 секундарних метаболита пореклом из мноштва различитих организама (www.chemnetbase.com), што је скоро сигурно само мали део једињења присутних у природи. Многа од ових једињења су биљног порекла. Упркос њиховој великој разноврсности, већина секундарних метаболита може се сврстати у једну од три групе: терпени,

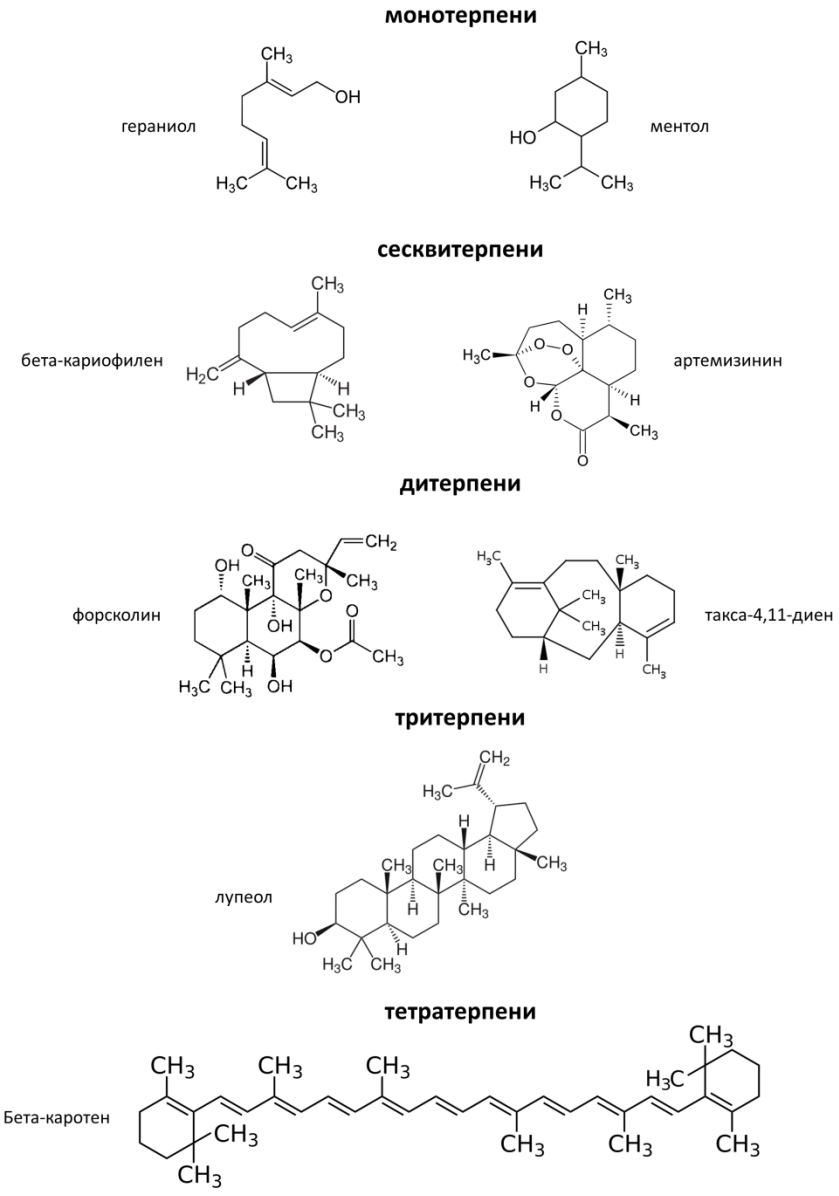
фенилпропаноиди и алкалоиди. Једињења из групе секундарних метаболита од значаја за овај рад јесу терпени.

1.2. Терпени

Терпенска једињења синтетишу сви прокариоти и еукариоти почев од бактерија, преко гљива и биљака, па све до животиња (Klayman, 1985; Barton и Cane, 1999; Ridley, 1999). Најконзервативније процене предлажу да у природи постоји барем 40.000 различитих терпенских једињења, од којих су многа биљног порекла (www.chemnetbase.com). Терпени, као део секундарног метаболизма, део су одбрамбеног механизма биљака, а такође омогућавају и главне еколошке адаптације у интеракцијама биљака са спољашњом средином. Терпени имају улогу у привлачењу полинатора и предаторних инсеката који се хране хербиворима; међу терпене спадају и фитоалексини, једињења налик феромонима, и токсини (El-Feraly и Chan, 1978; Lambers и Schepers, 1978; Facchini и Chappell, 1992; Jonathan Gershenzon и Dudareva, 2007). Терпени такође чине и део примарног метаболизма. У њих спадају хормони, фотосинтетички пигменти (каротеноиди), делови мембрана (фитостероли), и друга једињења неопходна за растење и развиће биљака, за одвијање метаболичких процеса и размножавање.

Велика хемијска разноврсност биљних терпена у природи одраз је мноштва биолошких активности које поседују. Из тог разлога, ова једињења су представљала током историје па све до данашњих дана, веома важне сировине за човека. Терпени се користе као ароме, мириси, додаци храни у виду витамина и заслађивача, или као пестициди. Такође се користе и као сировине за производњу великог броја индустријских материјала. Међутим, једна од све значајнијих улога терпена јесте она коју имају у фармацеутској индустрији. Камфор и цинеол користе се против болова изазваних опекотинама, истегнућима и сличним упалним реакцијама (Santos и Rao, 2000; Sarker и Nahar, 2007). Последњих година, артемизинин, сесквитерпен

кинеске лековите биљке *Artemisia annua,* показао се као значајно антималарично једињење (Balint, 2001), док је паклитаксел (познат и као таксол), дитерпен изолован из тисе (*Taxus* spp.), нови лек који се користи за лечење рака дојке и јајника (Saloustros и сар., 2008).



Слика 1. Хемијске труктуре неких представника основних група терпена.

У групу терпена спадају једињења са најразличитијим хемијским и физичким особинама. Могу бити липофилни или хидрофилни, испарљиви или неиспарљиви, циклични или ациклични. Хемијска разноврсност биљних терпена резултат је често веома комплексних биосинтетских путева. Сви терпени синтетишу се из *C5* изопренских јединица (свака јединица садржи пет угљеникових атома). Према броју *C5* изопренских јединица које садрже у својој структури, терпени се деле на: хемитерпене, монотерпене, сесквитерпене, дитерпене, тритерпене, тетратерпене и политерпене (Слика 1).

1.3. Синтеза терпена

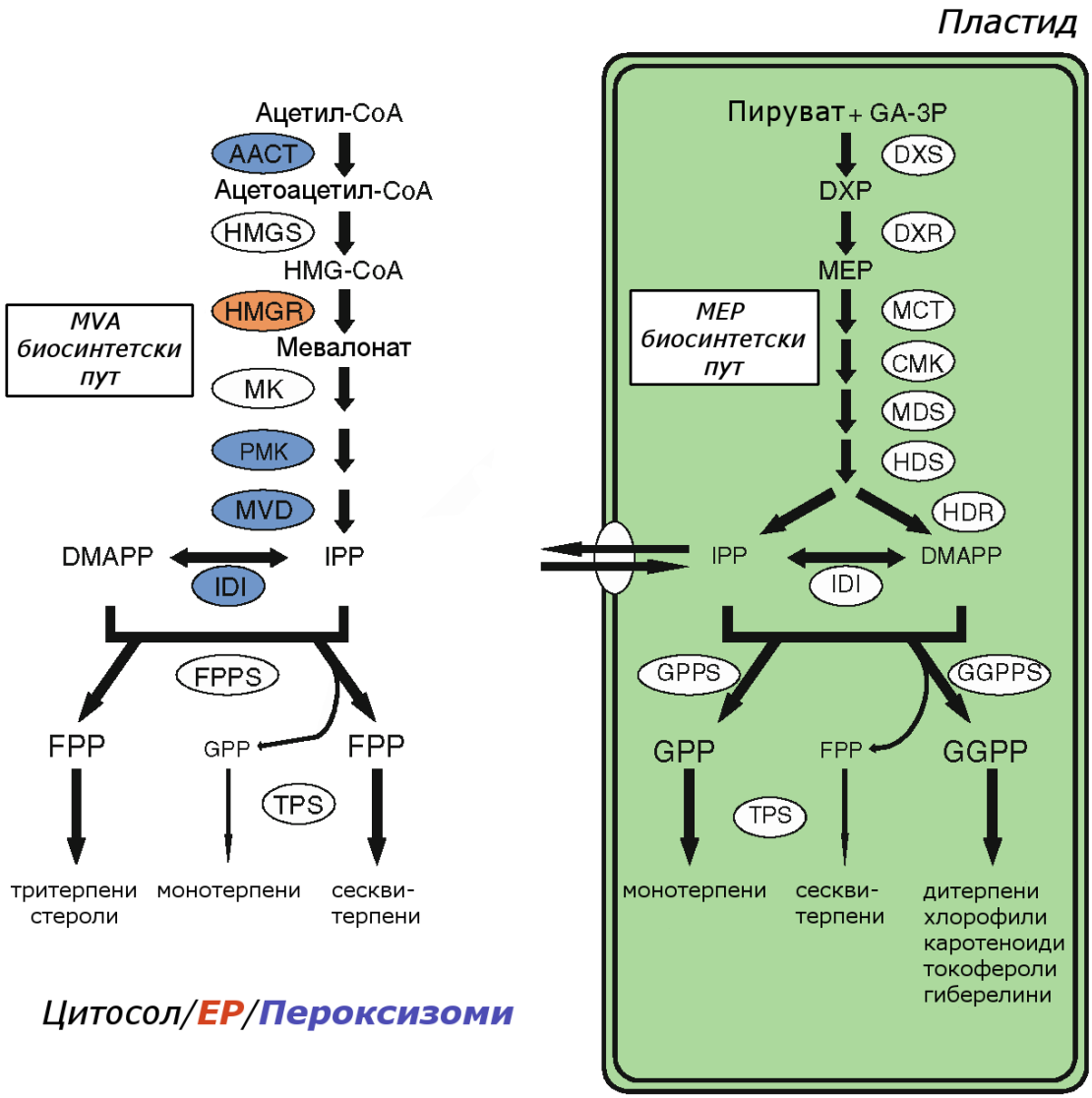
Биосинтетски пут терпена може се условно поделити на четири засебна дела:

1. Формирање изопентенил дифосфата (*IPP* — од старије варијанте имена — изопентенил пирофосфат), основне *C5* изопренске јединице.
2. Кондензација *C5* изопренских јединица.
3. Формирање основних карбонилних скелета.
4. Секундарне трансформације.

Први део биосинтетског пута, формирање *IPP*, и његовог изомера, диметилалил дифосфата (*DMAPP*), може да се одвија или мевалонатним (*MVA*) или метилеритритол-фосфатним (*MEP*) путем (Слика 2).

У другом делу пута кондензацијом *C5* изопренске јединице настају геранил дифосфат (*GDP*, *C10*), фарнезил дифосфат (*FDP*, *C15*) и геранилгеранил дифосфат (*GGDP*, *C20*). Основни карбонски скелети формирају се у трећој фази, када дифосфати (*C10–C20*) подлежу широком спектру циклизација и реакција реаранжирања. На овај начин, од *GDP*-а настају монотерпени, од *FDP* сесквитерпени, а од *GGDP* дитерпени. *FDP* и *GGDP* такође могу и међусобно да димеризују, чиме настају прекурсори „виших“ терпена (*C30* и

C40). Као резултат четврте фазе биосинтезе настаје на хиљаде различитих терпенских метаболита од основног скелета, реакцијама оксидације, изомеризације, коњугације и другим трансформацијама.



Слика 2. Метаболички путеви биосинтезе терпена код биљака (према *Maury* и сар., 2013).

1.3.1. Мевалонатни биосинтетски (*MVA*) пут

Биосинтетски пут који се одвија преко мевалоната, први пут је демонстриран код гљива и сисара, и све до недавног открића метилеритритол-фосфатног пута сматран је јединим начином синтезе *IPP*. Ланац хемијских реакција је добро познат и започиње кондензацијом три молекула ацетил коензима А (*AcCoA*) при чему настаје хидрокси-метилглутарил коензим *A* (*HMG-CoA*). *HMG-CoA* затим бива редукован у мевалонат у два корака, активношћу ензима *HMG-CoA* редуктазе (*HMGR*). За ову редукциону реакцију неопходна је редукована форма никотинамид аденин дифосфата (*NADPH*). *HMGR* игра регулаторну улогу у синтези биљних терпена, за шта постоје докази у бројним истраживањима која су показала уску корелацију између промена у активности HMGR и измена у стопи биосинтезе терпена (Ji и сар., 1993; Gaisser и Heide, 1996). Мевалонат даље бива преображен у *IPP* узастопним реакцијама катализованим од стране три различита ензима — мевалонат киназе, фосфомевалонат киназе и дифосфомевалонат декарбоксилазе.

1.3.2. Метилеритритол-фосфатни (*MEP*) пут

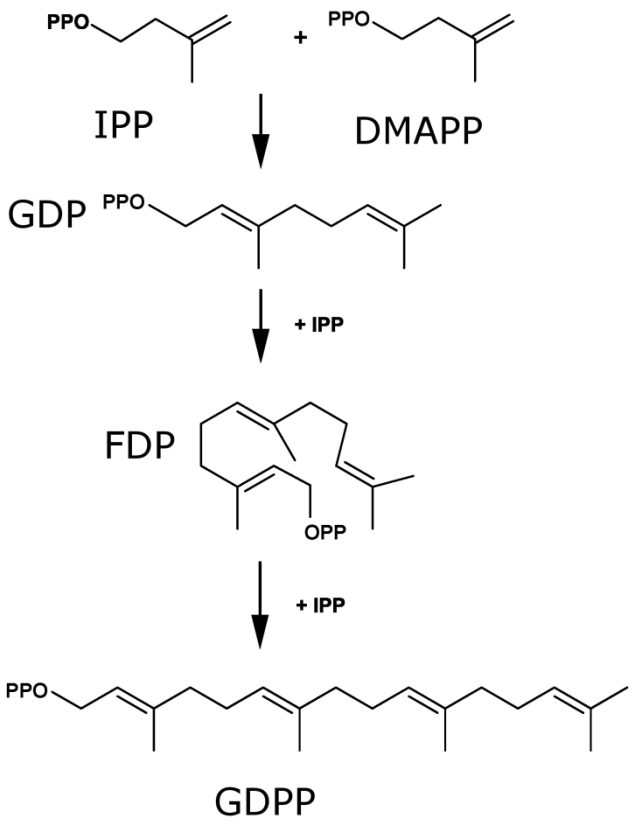
Веома значајан напредак у области биосинтезе биљних терпена било је откриће новог, потпуно засебног пута за стварање *C5* градивних блокова терпена (Lichtenthaler, 2000). Осим у биљкама, овај биосинтетски пут, који почиње глицералдехид фосфатом и пируватом, детектован је и у бактеријама и другим организмима. Рохмер је са својим сарадницима предложио (1996), на основу резултата истраживања на бактерији *Escherichia coli*, да почетни корак новог биосинтетског пута представља кондензацију хидроксиетилтиамин дифосфата (пореклом од пирувата) са глицералдехид фосфатом, при чему настаје дезоксиксилулозо фосфат (Rohmer и сар., 1996). Потврда ових резултата добијена је током претходне две деценије, успешном изолацијом *цДНК* ензима који катализују поменуте реакције код *E. coli*

(Sprenger и сар., 1997; Lois и сар., 1998), *Capsicum annuum* (Bouvier и сар., 1998) и питоме нане (*Mentha x piperita*) (Lange и сар., 1998). Наведени ензими спадају у групу транскетолаза и називају се дезоксиксилулозо фосфат синтазе (*DXS*). Реакција коју катализују је неповратна и дефинитивно усмерава угљеников атом ка *MEP* путу. Од дезоксиксилулозо фосфата даље се синтетише *MEP*, и то интрамолекулским реаранжирањима које катализује дезоксиксилулозо фосфат редуктоизомераза (*DXR*). Следеће једињење у ланцу јесте 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-*C*-метил-*D*-еритритол (*CDP-ME*) који настаје од *MEP*, активношћу 2-*C*-метил-*D*-еритритол 4-фосфат цитидилил трансферазе (*MCT*). 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-*C*-метил-*D*-еритритол киназа (*CMK*) даље фосфорилише хидроксилну групу на *C2* положају једињења *CDP-ME*, при чему настаје 2-фосфо-4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-*C*-метил-*D*-еритритол (*CDP-ME2P*). Следеће једињење које се синтетише јесте 2-*C*-метил-*D*-еритритол 2,4-циклодифосфат (*MEcPP*), а ензим задужен за овај корак назива се 2-*C*-метил-*D*-еритритол 2,4-циклодифосфат синтаза (*MDS*). *MEcPP* затим бива редукован у 4-хидрокси-3-метилбут-2-енилдифосфат (*HMBPP*) помоћу ензима *HMBPP* синтазе. Коначно, у последњем кораку, смеша једињења *IPP* и *DMAPP* настаје дејством ензима *HMBPP* редуктаза. За последње две реакције неопходан је *NADPH* као редукујући агенс.

За синтезу терпена у цитосолу и митохондријама користе се *IPP* и *DMAPP* настали *MVA* путем, док се у пластидима користе они настали *MEP* путем. Такође, показано је да постоји проток интермедијера између два биосинтетска пута, али и да је тај проток веома ограничен. Под одређеним срединским и еколошким условима, монотерпени, дитерпени, хемитерпени, сесквитерпени и политерпени, могу бити синтетисани од *IPP* који је настао како *MVA*, тако и *MEP* путем (Opitz и сар., 2014).

1.3.3. Склапање *C5* градивних блокова у *C10*, *C15* и *C20* пренил дифосфате

Другу фазу биосинтезе терпена чини повезивање основних *C5* градивних блокова и изградња већих метаболичких интермедијера.



Слика 3. Кондензација *IPP* и *DMAPP* и настанак *GDP*, *FDP* и *GGDP*.

IPP и његов реактивнији изомер *DMAPP*, врше међусобну кондензацију по принципу везивања глава-реп, при чему настају *C10*, *C15* и *C20* пренил дифосфати (Слика 3). *DMAPP* настаје директно из *IPP*, активношћу *IPP*

изомеразе, која катализује реакције у оба смера. У току последње две деценије, гени који кодирају овај ензим изоловани су из неколико различитих биљних врста, између осталог из врста *A. thaliana* (Okada и сар., 2008) и *Clarkia breweri* (Blanc и Pichersky, 1995). *IPP* и *DMAPP* настали на овај начин даље бивају укључени у основне реакције којима се *C5* изопренске јединице међусобно спајају. Ензими пренилтрансферазе додају различит број јединица *IPP* на *DMAPP* у серији сукцесивних екстензија. Почетном кондензацијом *IPP* и *DMAPP* у оријентацији глава-реп настају *GDP* у транс-конфигурацији или нерил дифосфат (*NPP*) у цис-конфигурацији. Ове реакције катализују транс-пренилтрансферазе (*TPT*) или цис-пренилтрансферазе (*CPT*) (Burke и сар., 1999; Schilmiller и сар., 2009; Akhtar и сар., 2013). Цис-пренилтрансферазе су укључене у синтезу политерпена, између осталог и гуме (Cunillera и сар., 2000; Asawatreratanakul и сар., 2003; Schmidt и сар., 2010; Kera и сар., 2012; Post и сар., 2012). Недавно, су идентификовани и *CPT* ензими парадајза (*Solanum lycopersicum*) укључени у синтезу неколико цис-пренил дифосфата кратког ланца- нерил дифосфата, нерилнерил дифосфата и 2*Z*,6*Z*-фарнезил дифосфата (*Z,Z-FDP*) (Schilmiller и сар., 2009; Falara и сар., 2011; Akhtar и сар., 2013; Matsuba и сар., 2013).

Даљим додавањем молекула *IPP* на *GDP* настају *FDP* и *GGDP*. Код биљака, *FDP* и *GGDP* синтетишу се активношћу добро окарактерисаних специфичних ензима који катализују серију екстензија из два или три корака, почевши од *IPP* и *DMAPP*. Тако, *GGDP* синтазе директно производе *GGDP* од прекурсора *IPP* и DMAP (Dogbo и Camara, 1987; Laskaris и сар., 2000; Irene Pateraki и Kanellis, 2008). Реакција се одвија преко *FDP* и *GDP* као интермедијера, с тим што под нормалним условима, тек *GGDP* напушта активно место ензима. Такође, пронађене су и биљне пренилтрансферазе које синтетишу искључиво *GDP* (R Croteau и Purkett, 1989; Clastre и сар., 1993; Tello и сар., 2008). Наведене пренилтрансферазе могу бити важни регулаторни ензими у синтези биљних терпена јер се налазе на основним местима рачвања биосинтетског пута, и могу да усмеравају проток прекурсора између различитих великих

група терпена. Још један вид регулације синтезе терпена постиже се и локализацијом специфичних пренил трансфераза у одређеним врстама ткива или у засебним ћелијским одељцима. Пример за то јесте и *GDP* синтаза из жалфије (*Salvia officinalis)*, која је локализована само у секреторним ћелијама жлезданих длака, једином ткиву жалфије где се синтетишу монотерпени (Croteau и Purkett, 1989).

1.3.4. Изградња основних карбонилних скелета

Пренил дифосфати могу даље представљати прекурсоре за терпене који чине део примарног метаболизма. На пример, кондензацијом два *FDP* молекула у глава-глава оријентацији синтетише се сквален, прекурсор стерола, а кондензацијом два *GGDP* молекула добија се фитоен, прекурсор каротеноида. *GGDP* је такође и прекурсор гиберелина, биљних хормона. Наиме, пар структурно блиских терпен синтаза у голосеменицама и скривеносеменицама, копалил дифосфат синтаза (CPS) и каурен синтаза (KS), претварају *GGDP* у копалил дифосфат (*CDP*) а затим у *ent*-каурен, прекурсор свих биљних гиберелина (Yamaguchi, 2008). Од пренил дифосфата такође се синтетишу основни карбонилни скелети свих терпена који чине део секундарног метаболизма. *DMAPP* даје изопрен, *GDP* и NPP дају различите цикличне и ацикличне монотерпенске хидроугљенике (*C10*) и монотерпенске алкохоле, *FDP* даје различите цикличне и ацикличне сесквитерпенске хидроугљенике (*C15*) и сесквитерпенске алкохоле, а *GGDP*, *CDP* или хидроксил-*CDP* дају различите цикличне и ацикличне дитерпенске хидроугљенике (*C20*) и дитерпенске алкохоле (Tholl, 2006). Терпен синтазе које катализују наведене реакције деле се на монотерпен, сесквитерпен и дитерпен синтазе, на основу типа терпена који синтетишу. Такође, на основу механизма реакције и производа који се формира, биљне терпен синтазе могу да се поделе на ензиме класе I и класе II. Пример ензима који припада класи II је копалил дифосфат синтаза (CPS). Овај ензим врши синтезу *CDP* преко циклизације *GGDP* индуковане протонизацијом. Међутим, већина познатих

биљних терпен синтаза припадају класи I. У почетном кораку ензимске реакције коју катализују ови ензими, пренил дифосфат се јонизује и формирају се карбокатјонски интермедијери. Интересантно је то да једна терпен синтаза користећи само једно једињење као субстрат, може произвести више различитих производа (Christianson, 2006; Degenhardt и сар., 2009). На пример, AtTPS-Cin из *Arabidopsis thaliana* катализује синтезу чак десет монотерпена, од којих је 1,8-цинеол најзаступљенији производ (F. Chen и сар., 2004).

Код маховине *Physcomitrella patens* постоји само један функционални ген за терпен синтазу, CPS/KS, коју одликује хомологија са CPS, KS, и другим терпен синтазама голосеменица и скривеносеменица (Hayashi и сар., 2006). Ова терпен синтаза катализује формирање *ent*-каурена и 16-хидроксикаурена, прекурсора у путу синтезе гиберелина. *N*-терминални домен протеина има одлике активног места ензима CPS, тј. одлике дитерпен синтазе класе II. Активност карактеристична за дитерпен синтазе класе I (KS ензими) локализована је на *C*-терминалној половини протеина. Анализа генске секвенце показала је да су и код голосеменица, и код скривеносеменица, гени *CPS* и *KS* добијени дупликацијом описаног предачког *CPS/KS* гена, при чему је сваки од дупликата гена задржао само једну од две активности (Keeling и сар., 2010). Осим биљака, гиберелине садрже и неке гљиве и бактерије. Код гљива, синтезу врши двофункционални ензим, слично као код маховина (Toyomasu и сар., 2000). Насупрот томе, код бактерија се синтеза гиберелина одвија слично као код виших биљака, уз помоћ два засебна монофункционална ензима (Morrone и сар., 2009). Анализа секвенци указује на заједничко еволутивно порекло дитерпен синтаза укључених у синтезу гиберелина али и сродних дитерпена код биљака, гљива и бактерија.

Слична дупликација и редукција или мењање функције десила се и код гена секундарног метаболизма, приликом еволуције терпен синтаза од предачког *CPS/KS* гена (Trapp и Croteau, 2001; Keeling и сар., 2010).

Монофункционалне дитерпен синтазе описане су како код голосеменица, тако и код скривеносеменица (Gao и сар., 2009; Keeling и сар., 2010; Caniard и сар., 2012; Sallaud и сар., 2012; Hall и сар., 2013). Такође, једна монофункционална дитерпен синтаза из ликофите *Selaginella moellendorffii* недавно је окарактерисана (G. Li и сар., 2012). Двофункционалне дитерпен синтазе из нижих биљака (Hayashi и сар., 2006; Kawaide и сар., 2011), ликофите *S. moellendorffii* (Sugai и сар., 2011) и голосеменица (Martin и сар., 2004; Zerbe и сар., 2012; Hall и сар., 2013) до сада су успешно окарактерисане.

За све монотерпен и сесквитерпен синтазе верује се да су монофункционалне. Активно место које је код њих опстало јесте оно које одговара активности ензима класе I код предачког ензима. У највећем броју случајева, регион ензима који садржи друго активно место (класе II) је у потпуности изгубљен, уз мали број изузетака (Dudareva и сар., 1996; Leonhardt и сар., 2009; Schilmiller и сар., 2009).

Све терпен синтазе голосеменица и скривеносеменица имају структуру произашлу од тро-доменског предачког ензима (Сао и сар., 2010). Варијације тро-доменске структуре код многих од добро окарактерисаних биљних терпен синтаза могу бити објашњене губитком одређеног домена или губитком активности повезане са одређеним доменом. Из тог разлога дужина терпен синтаза варира, и креће се од 600 па све до 900 амино киселина.

Активно место ензима класе I налази се на С-терминалном домену и чине га *DDXXD* и *NSE/DTE* мотиви за јонизацију пренил дифосфата зависну од присуства јона метала. Активност ензима класе II зависи од *DXDD* мотива за циклизацију *GGDP* у *CDP* иницирану протонацијом. Такође, већина монотерпен и дитерпен синтаза у својој структури садржи транзитни пептид, који указује на финалну локализацију ензима у пластидима, за разлику од сесквитерпен синтаза које су цитосолне.

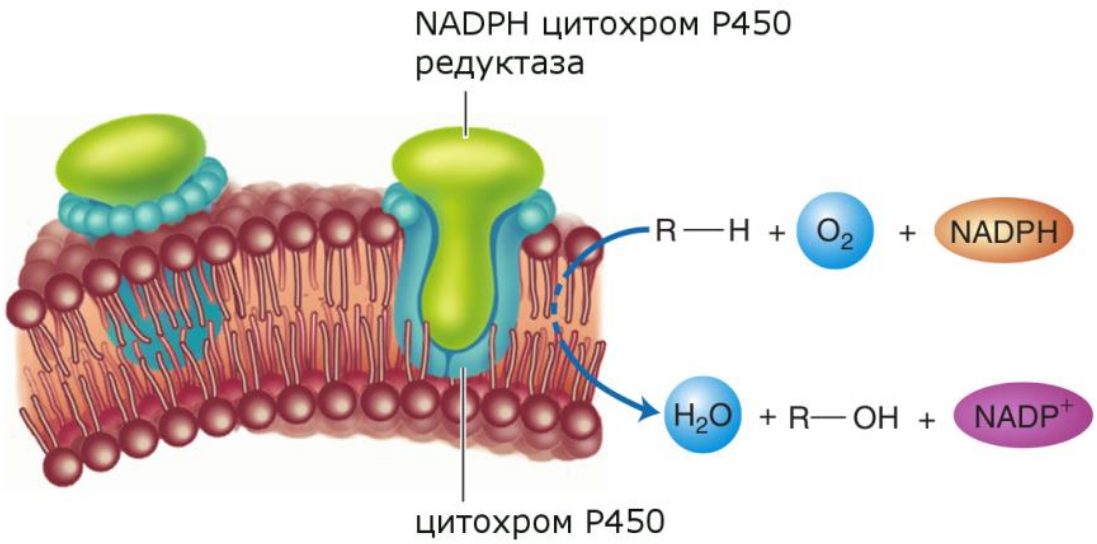
1.3.5. Секундарне трансформације терпена

Након синтезе разноврсних основних структура хемитерпена, монотерпена, сесквитерпена и дитерпена у виду олефина или једноставних оксидованих једињења од стране терпен синтаза, ови метаболити могу бити додатно модификовани, најчешће оксидацијом, ацилацијом или гликозилацијом. Резултат ових измена јесте стварање изузетно великог броја испарљивих и неиспарљливих једињења са најразличитијим функцијама, а ензими који катализују наведене реакције спадају у групу CY*P450* монооксигеназа, редуктаза, дехидрогеназа и различитих трансфераза (Bohlmann и Keeling, 2008).

1.3.5.1. Цитохром *P450* монооксигеназе

Цитохром *P450* монооксигеназе (CY*P450*) обухватају класу ензима присутну у свим групама организама укључујући животиње, бактерије, гљиве, архее, протисте, па чак и вирусе. Укупан број до сада идентификованих CY*P450* ензима достигао је више од 21.000 у 2013. години (http://drnelson.uthsc.edu/P450.stats.Aug2013.png). Највећа група ових ензима присутна је у биљкама (7.466 ензима), што је и главни разлог огромног броја структурно разноврсних природних производа у овом краљевству. Иако CYP450 ензими не показују висок степен међусобне сличности у погледу аминокиселинске секвенце, постоји неколико апсолутно конзервираних мотива, као што су место за везивање O_2, *PERF* мотив, *KETLR* мотив, као и домен за везивање хем јединице. Такође, упркос великој разлици у примарној структури ових ензима, терцијерна структура је прилично конзервирана, што су показале анализе кристалне структуре (Poulos и сар., 1985). По номенклатури CYP450 ензима, на почетку назива се налази префикс *CYP*, после којег долази број који означава породицу, затим велико слово које означава подпородицу, па опет број који означава појединачни ген или протеин (Nebert и сар., 1991; D. R. Nelson и сар., 1993).

CYP450 ензими су протеини са хем простетичном групом. Хем се састоји из порфиринског језгра у чијем центру се налази један атом гвожђа. Функција CYP450 ензима као монооксигеназа огледа се у везивању супстрата и једног од два атома молекулског кисеоника, док други атом бива редукован до H_2O. У овој реакцији *NAD(P)H* служи као редуктант. Катализа се остварује на тај начин што се молекулски кисеоник активира редукујућим еквивалентима пренетим од *NADPH* до CYP450 ензима посредством флавопротеина *NADPH*: цитохром *P450* редуктазе. Код биљака је присутно две или више форми редуктаза. Оне заједно са CYP450 ензимом чине ензимски систем *P450*, који је везан за мембрану ендоплазматичног ретикулума (Слика 4).



Слика 4. Ензимски систем *P450* (према McKee и McKee, 2008).

CYP450 ензими играју важну улогу у преживљавању биљака на тај начин што метаболишу ксенобиотике и синтетишу различита једињења за заштиту од непријатеља (Schuler, 1996; Werck-Reichhart и сар., 2002). Цијаногенични глукозиди биљке *Sorghum bicolor* (Halkier и Møller, 1991) и глукозинолати из

A. thaliana (Du и сар., 1995; Wittstock и Halkier, 2000; Chen и сар., 2003) синтетишу се у биосинтетским путевима који садрже по неколико CYP450 ензима. Међу једињењима чију синтезу катализују CYP450 ензими налазе се интермедијери лигнина, стероли и терпени (Bolwell и сар., 1994; Schuler, 1996). Од терпена, ови ензими синтетишу моно-, сескви-, ди- и тритерпене (Bolwell и сар., 1994). У врсти *Pinus taeda* синтезу дитерпенских киселина смоле катализују мултифункционални CYP450 ензими (Ro и сар., 2005). CYP450 ензими такође катализују хидроксилацију сесквитерпена цикорије (*Cichorium intybus*) (de Kraker и сар., 2003). Реакције хидроксилације катализоване CYP450 ензимима, често су веома специфичне за позицију атома на молекулу субстрата, што одређује судбину производа низводно у биосинтетском путу (Schuler, 1996). Код питоме нане, (-)-*S*-лимонен може бити хидроксилован или на C3 или на C6 атому (Lupien и сар., 1995). Хидроксилацијом C6 атома настаје карвеол, док хидроксилација C3 атома резултира формирањем изопиперитенола, из којег затим настаје ментол (R Croteau, 1991; Lupien и сар., 1995).

1.4. Жлездане длаке као места синтезе и складиштења секундарних метаболита

Жлездане длаке, заједно са нектаријама и хидатодама, спадају у спољашње секреторне структуре биљака. Осим жлезданих, на површини многих врста могу се налазити и нежлездане длаке, које могу бити негранате, гранате, звездасте, и које не спадају у секреторна ткива. Жлездане длаке такође постоје у мноштву облика и структура, али оно што им је заједничко, јесте да поседују метаболички активне ћелије са могућношћу секреције и складиштења велике количине секундарних метаболита. Распрострањеност жлезданих длака у биљном царству указује на прилично дугу еволуцију ових структура. Идентификоване су на фосилном материјалу листа папрати из касног палеозоика (Krings и Kerp, 1998) и касног карбона (Krings и сар., 2003). Такође су присутне и у неким врстама савремених папрати (Wollenweber и

сар., 1998). Не постоје налази жлезданих длака у бриофитама, па се претпоставља да су се појавиле тек код васкуларних биљака. Жлездане длаке најчешће су код скривеносеменица (Fahn, 1988; Wagner и сар., 2004), док се код голосеменица јављају изузетно ретко (млади листови врста *Pinus cembra* и *Pinus lambertiana* (Fahn, 1988)). Неке породице дикотила посебно су богате жлезданим длакама — Lamiaceae, Solanaceae, Asteraceae и Cannabaceae. Жлездане длаке могу се поделити на капитатне и пелтатне. Капитатне се састоје од базалне ћелије епидермалног порекла, дршке од једне или више ћелија и главе изграђене од једне или две секреторне ћелије. Пелтатне длаке састоје се од базалне ћелије, једне ћелије која представља дршку, и широке главе сачињене од више секреторних ћелија. У вршном делу зреле пелтатне длаке формира се карактеристичан субкутикуларан простор, који настаје одвајањем кутикуле од ћелијског зида главе длаке. Пелтатне длаке често леже у равни листа, јер су утиснуте у епидермис. Осим по морфологији, жлездане длаке могу да се разликују и по типу једињења које производе: хидрофилна и липофилна једињења, протеине, поли- и моносахариде. Такође, длаке могу да се поделе и по испарљивости синтетисаних једињења. Испарљива једињења, попут моно- и сесквитерпена, фенилпропана или метилкетона, морају бити на неки начин задржана унутар биљке како не би била изгубљена простом дифузијом. Неке врсте, као што су питома нана или жалфија, поседују пелтатне жлездане длаке изузетно добро адаптиране за задржавање и складиштење испарљивих једињења (McCaskill и сар., 1992). Код њих испарљива једињења бивају ослобођена из субкутикуларног простора тек након пуцања кутикуле, до чега нејчешће долази услед дејства инсеката. Са друге стране, капитатни жлездане длаке синтетишу неиспарљива или слабо испарљива једињења, која се излучују директно на површину длаке (Falara и сар., 2008). Жлездане длаке су важна таксономска карактеристика, и играју значајну улогу у класификацији припадника фамилије Lamiaceae.

Пионирска испитивања биохемије и физиологије жлезданих длака указала су на интензиван метаболизам у секреторним ћелијама, и на могућност да би

једињења које оне излучују могла такође бити у њима и синтетисана. Један од доказа за *in situ* биосинтезу једињења које жлездане длаке излучују дошао је из истраживања рађеним на врсти *Mentha spicata*. Примећена је активност лимонен хидроксилазе и карвеол дехидрохеназе у екстрактима ових жлезданих структура (Gershenzon и сар., 1989). Додатне информације добијене су истраживањем уз помоћ имунолокализације у врстама *Mentha spicata* и *Mentha x piperita*. Код врсте *Mentha spicata* лимонен синтаза и геранил дифосфат синтаза локализиване су у леукопластима секреторних ћелија жлезданих длака, док је у глатком ендоплазматичном ретикулуму детектована 4-S-лимонен-6-хидроксилаза (цитохром *P450*) (Turner и сар., 1999; Turner и Croteau, 2004). Два друга ензима, укључена у следеће кораке биосинтетског пута ментола, детектована су у митохондријама и у цитосолу (Turner и Croteau, 2004). Клонирање гена укључених у метаболичке путеве жлезданих длака омогућило је и карактеризацију промотора специфичних за ова ткива. До сада су познати промотори специфични за жлездане длаке дувана, лаванде и врсте *Artemisia annua* (Biswas и сар., 2008; Ma и сар., 2009; Ennajdaoui и сар., 2010).

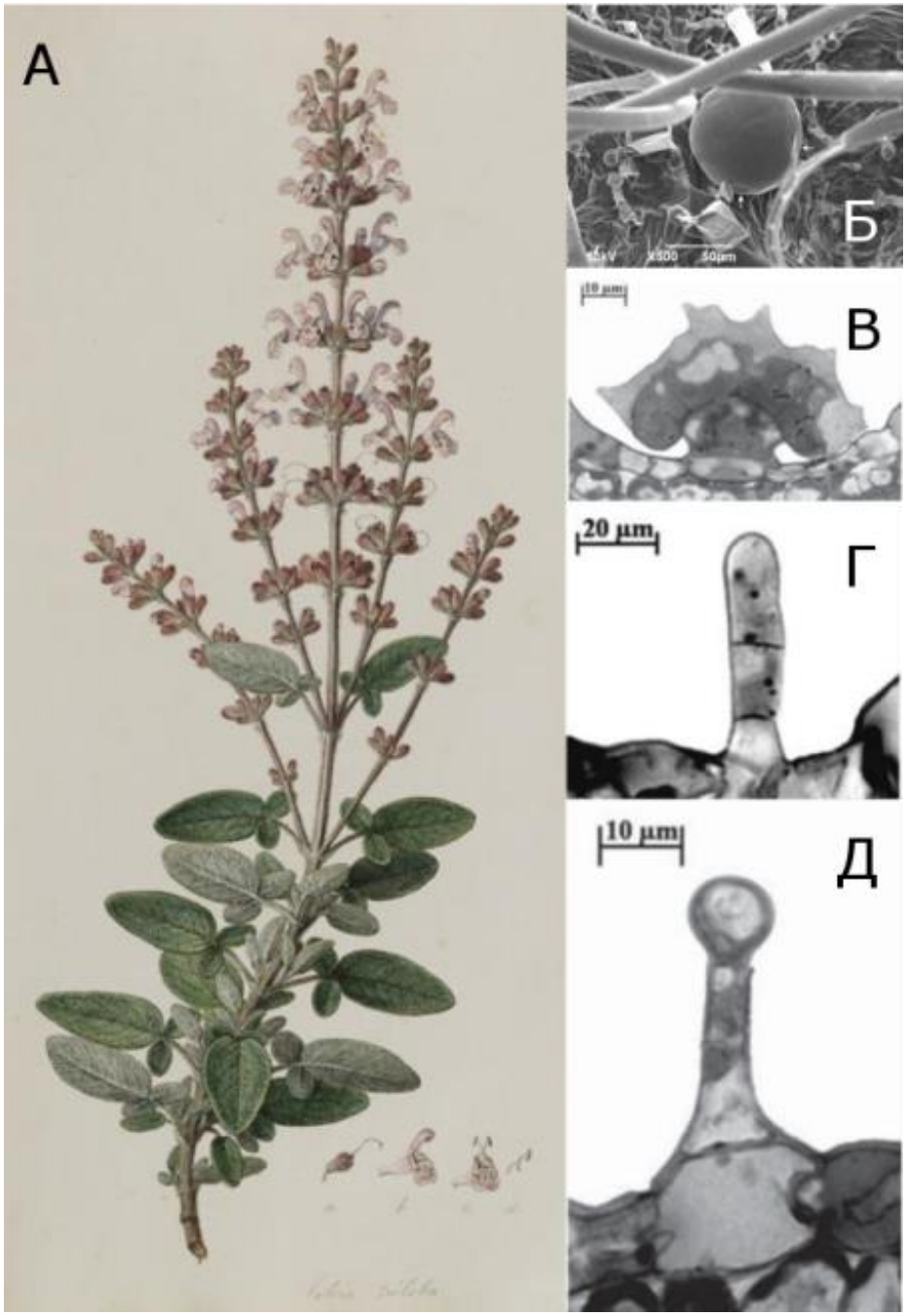
1.5. Секундарни метаболити биљака породице Lamiaceae, са освртом на родове *Salvia* и *Rosmarinus*

Породица Lamiaceae састоји се од око 230 родова и 7100 врста, распрострањених широм света (Bräuchler и сар., 2010). Многи припадници ове породице користе се у медицини, кулинарству и козметичкој индустрији. Етарска уља синтетишу се у жлезданим длакама на површини надземних вегетативних и репродуктивних органа. Екстракти многих врста породице Lamiaceae поседују висок антиоксидативни потенцијал. Такође, у широкој употреби су и због својих антимикробних својстава. Међу најпознатије родове спадају *Rosmarinus, Salvia Mentha, Sideritis* и *Thymus*. У овом раду анализиране су две врсте породице Lamiaceae — *Salvia fruticosa* и *Rosmarinus officinalis*.

1.5.1. *Salvia fruticosa*

Salvia fruticosa, (Слика 5) ароматична зељаста биљка или жбун, ендемит је источне медитеранске регије. Простире се од јужне Италије и Сицилије, па све до Палестине, настањујући станишта са гаригом и макијом. Расте до 1000 *m*, ретко до 1350 *m* надморске висине (Karousou и сар., 2000). Сама биљка расте до 100 cm висине, а величина листова варира од 3 *cm* до 10 *cm*. *S. fruticosa* спада међу комерцијално најкоришћеније врсте жалфије, а назива се још и грчка или медитеранска жалфија. Чак 50-90% суве жалфије која се увози у САД представља управо грчку жалфију (Tucker и сар., 1980). Још од давних времена жалфија се користи због својих медицинских својстава, али и због естетске и кулинарске вредности. Такође, значајна је као медоносна биљка, а користи се и у индустрији парфема (Rivera и сар., 1994). Грчка жалфија призната је као медицинска биљка и сврстана је у Европску и Британску фармакопеју (Торси и сар., 2013). .

Грчка жалфија садржи значајне количине етарског уља жуте боје, које се састоји од великог броја различитих једињења. Најзаступљенија једињења су оксидовани монотерпени (1,8-цинеол, камфор, борнеол, *α*- и *β*-тујон), монотерпенски хидроугљеници (камфен, *α*- и *β*-пинен, мирцен), сесквитерпени (кариофилен), док се дитерпени налазе у малој количини (маноол и лабд-7,13-диен-15-ол) (Putievsky и сар., 1986; Bayrak и Akgül, 1987; Länger и сар., 1996; Skoula и сар., 2000; Karioti и сар., 2003; Pitarokili и сар., 2003; Papageorgiou и сар., 2008). У многим публикацијама извештава се о високом нивоу варијабилности у количини и саставу етарског уља пореклом из различитих популација и из различитих клонова грчке жалфије (Catsiotis и Iconomou, 1984; Karousou и Kokkini, 1997). Варијације у приносу и саставу етарског уља потичу од разлика у генетским профилима популација (Melpomeni Skoula и сар., 1999; Skoula и сар., 2000; Pitarokili и сар., 2003), и од фактора спољашње средине (Papageorgiou и сар., 2008).



Слика 5. Грчка жалфија (*Salvia fruticosa*). А. Изглед целе биљке (илустровао *F.L.Bauer*, према *Sibthorp* и *Smith*, *Flora Graeca* 1 (1), 1806). Б-Д: Типови жлезданих длака (према *Al* и сар., 2013). Б. *SEM* микрографија пелтатне жлездане длаке. В. Микрографија пелтатне жлездане длаке која приказује базалну епидермалну ћелију, кратку ћелију дршке, и велику лоптасту главу која се састоји од осам секреторних ћелија. Г. Микрографија дигитиформне жлездане длаке. Д. Микрографија капитатне жлездане длаке.

Једињења изолована из грчке жалфије коришћена су у великом броју истраживања, у којима су утврђена њихова хипогликемијска (Yaniv и сар., 1987; Perfumi и сар., 1991), холинергичка (Savelev и сар., 2004) и антифунгална активност (Adam и сар., 1998; Ali-Shtayeh и Abu Ghdeib, 1999; Daferera и сар., 2000; Soković и сар., 2002; Pitarokili и сар., 2003). Такође, установљена су и антиинфламаторна, антимикробна, антивирусна и цитотоксична дејства (Sivropoulou и сар., 1997; Kaileh и сар., 2007; Longaray Delamare и сар., 2007). Осим испарљивих једињења етарског уља, веома су значајна и фенолна једињења грчке жалфије, као што су карнозинска киселина и карнозол, а која су заслужна за њена антиоксидативна својства (Exarchou и сар., 2002; Pizzale и сар., 2002; Matsingou и сар., 2003; Ozcan, 2003; Papageorgiou и сар., 2008).

Производња, складиштење и излучивање етарског уља одвија се великим делом у жлезданим длакама грчке жалфије, којима је покривена читава површина њених надземних делова. Густина длака је највећа код младих листова, на доњој (абаксијалној) површини, и посебно на маргинама листа (Karousou и сар., 2000; Sheef и сар., 2013). Шиф (Sheef) је са сарадницима 2013. године извршио микроморфолошку и ултраструктурну анализу површинских структура грчке жалфије. Жлездане длаке јављају се у три главна облика – пелтатни, капитатни и дигитиформни. Пелтатне длаке су облика балона, и састоје се од базалне епидермалне ћелије, врло кратке једноћелијске дршке, и велике лоптасте главе која се састоји од осам секреторних ћелија које формирају круг. Површина им је глатка, што указује на присну повезаност кутикуле и горњих зидова секреторних ћелија. Велики простор у којем се врши складиштење синтетисаних метаболита развија се у периоду излучивања издизањем кутикуле. Капитатне длаке састоје се од једне базалне ћелије, једне, две, или три ћелије дршке и једне или две ћелије главе. Глава капитатних жлезданих длака увек се јасно разликује од осталих ћелија својим лоптастим или јајастим обликом. Дигитиформне длаке чини једна базална ћелија, једна до две ћелије дршке и једна вршна секреторна ћелија.

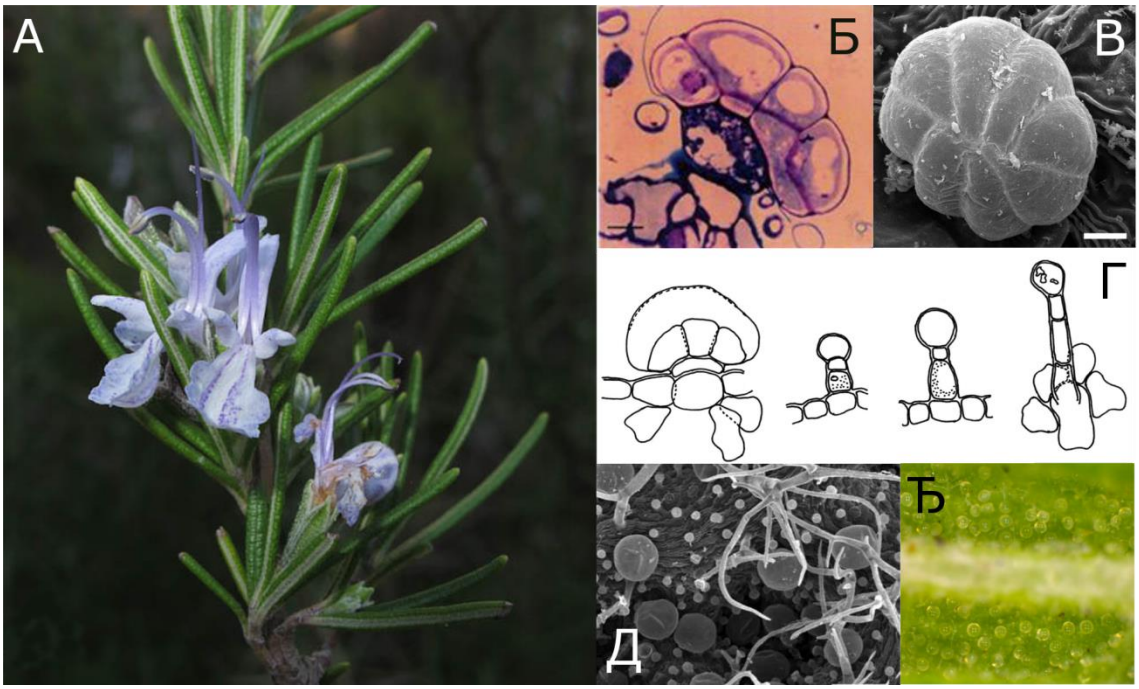
Све ћелије су сличног пречника и приближно једнаке дужине, без јасне разлике између главе и дршке длаке. Овај тип жлезданих длака до сад је описан код још неколико прдставика породице Lamiaceae (Ascensão и сар., 1999; Rezakhanlo и Talebi, 2010; Jia и сар., 2013; Mota и сар., 2013; Rusydi и сар., 2013).

1.5.2. *Rosmarinus officinalis*

Једна од најпознатијих врста породице Lamiaceae јесте *Rosmarinus officinalis* (рузмарин) (Скила 6). Рузмарин је широко распрострањен у медитеранској области Европе, Азије и Африке (Pintore и сар., 2002). Ова ароматична зимзелена жбунаста биљка добро је, као склерофита, адаптирана на медитеранске климатске услове. Одликују је игличасти листови налик листовима четинара. Најчешће се налази у близини обале, на кречњачкој подлози (Marin и сар., 2006; Papageorgiou и сар., 2008). Осушени листови рузмарина користе се као зачин у медитеранској кухињи. Коришћење рузмарина у кулинарству, не само да поправља и мења укус јелима, већ такође и успорава пропадање хране, за шта су заслужна антимикробна и антиоксидативна својста ове биљке (Fernández-López и сар., 2005). Рузмарин се такође користи и као декоративна биљка, због лепог изгледа и пријатног мириса, а такође и у индустрији парфема и козметике (сапуни, креме, шампони), као и у пчеларству.

Етарско уље рузмарина састоји се углавном од оксидованих монотерпена (1,8-цинеол, борнеол, *R*-терпинеол) и монотерпенских угљоводоника (*R*-пинен, *p*-цимен, камфен) (Papageorgiou и сар., 2008). Од давних времена, рузмарин је значајан као медицинска биљка, а у скорашње време све већа пажња се поклања испитивању његових антимикробних, антиинфламаторних и антиоксидативних својстава (Kuhlmann и Röhl, 2006). Етарско уље рузмарина поседује антимикробна својства (Sacchetti и сар., 2005; Celiktas и сар., 2007; Jordán и сар., 2012; Jordán и сар., 2014), а такође позитивно утиче и

на когнитивне процесе (Zheng и Wang, 2001; Gachkar и сар., 2007; Wang и сар., 2008; Ozarowski и сар., 2013). Поред тога, етарско уље рузмарина одликује се и хепатопротективним својствима (Fahim и сар., 1999; Amin и Hamza, 2005; Kuhlmann и Röhl, 2006), побољшава циркулацију крви, умањује бол (De Feo и Senatore, 1993; Lukaczer и сар., 2005) и поседује антиканцерогена својства (Pitarokili и сар., 2003; Johnson, 2011).



Слика 6. Рузмарин (*Rosmarinus officinalis*). А. Бочна грана са цветовима (http://www.apatita.com/herbario/Labiatae/Rosmarinus_officinalis.html). Б-Ђ: Типови жлезданих длака. Б. Микрографија пелтатне жлездане длаке (према *Marin* и сар., 2006). В. Секреторна глава пелтатне жлездане длаке (према *Boix* и сар., 2011). Г. Шема морфологије жлезданих длака (према *Boix* и сар., 2011). Д. Нежлездане, капитатне и пелтатне жлездане длаке на абаксијалном епидермису (према *Boix* и сар., 2011). Ђ. Изглед површине абаксијалне стране листа (http://murry-gans.blogspot.com/2012/09/rosemarys-spider.html).

Екстракт рузмарина у веома малим дозама показује инхибиторни ефекат на *HIV* вирус (Aruoma и сар., 1996). Код мишева је испитиван и ефекат рузмарина на ублажавање негативних симптома одвикавања од морфина и опијума (Hosseinzadeh и Nourbakhsh, 2003; Solhi и сар., 2013). Рузмарин такође представља потенцијалан третман за лечење гојазности и дијабетеса типа 2 (Cui и сар., 2012).

R. officinalis се сматра биљном врстом са највећом природном антиоксидативном активношћу (Peng и сар., 2005), а екстракт рузмарина је био први природни антиоксиданс који се појавио на тржишту. Користи се у индустрији хране као алтернатива синтетичким антиоксидансима. Екстракт рузмарина додаје се уљима и храни која садржи масноће, као што је рибље уље (Medina и сар., 2003; Wang и сар., 2011), уље семена биљака (Hraš и сар., 2000; Trojáková и сар., 2001) и месни производи (Shahidi, 1995), како би се успорила оксидација и продужило време складиштења ових производа. Такође, рузмарин и његов екстракт штите биолошка ткива од оксидативног стреса *in vivo*. Једињења најодговорнија за антиоксидативну активност рузмарина јесу карнозинска киселина и карнозол (Inatani и сар., 1982; Richheimer и сар., 1996). Ова једињења спадају у групу фенолних дитерпена. Карнозинска киселина и карнозол не налазе се у етарском уљу рузмарина, већ у биљном материјалу који остаје након дестилације (Navarrete и сар., 2011). И друга фенолна једињења, као што су рузмаринска киселина, розманол и епирозманол такође доприносе антиоксидативним својствима екстракта рузмарина, али у много мањој мери (Inatani и сар., 1982). Такође су присутни и каротеноиди и алфа-токоферол (Munné-Bosch и сар., 1999).

Истраживања су показала да на концентрацију карнозинске киселине и осталих фенолних дитерпена у листовима рузмарина утиче старост листа, а такође је забележено и сезонско варирање (Hidalgo и сар., 1998; Munné-Bosch и сар., 2000). Концентрација карнозинске киселине опада са појачавањем сунчевог зрачења и температуре (Luis и сар., 1994; Munné-Bosch и сар., 1999,

2000; Munné-Bosch и Alegre, 2001; del Baño и сар., 2003). Такође, и генетички фактор значајно утиче на хемијски састав рузмарина (Jordán и сар., 2011).

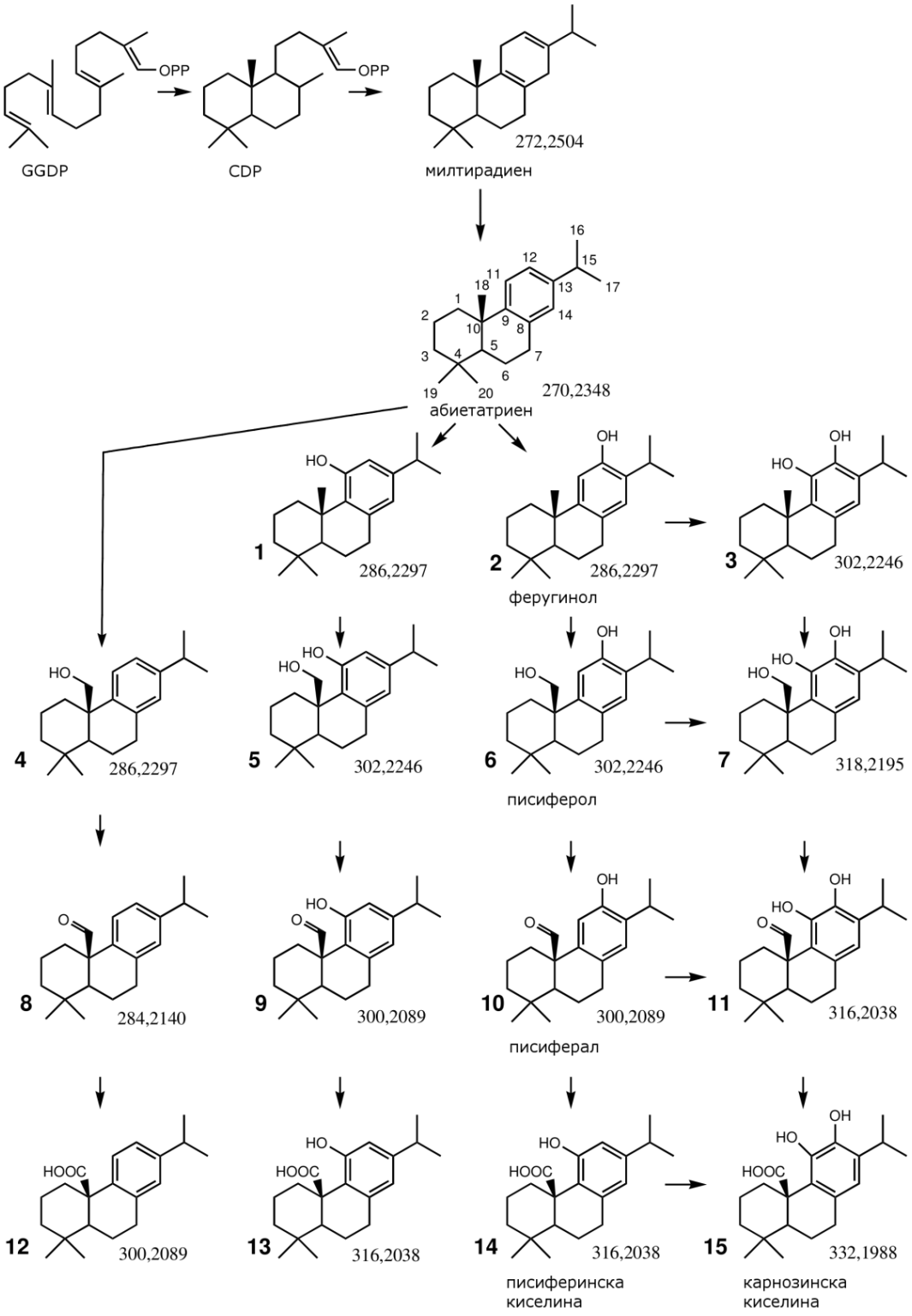
На површини епидермиса рузмарина налазе се вишећелијске нежлездане и жлездане длаке, које су посебно бројне на абаксијалној страни листа (Marin и сар., 2006; Boix и сар., 2011). Међу нежлезданим длакама налазе се негранате у мањем броју, док су у већем броју заступљене вишећелијске гранате длаке (Marin и сар., 2006). Од жлезданих длака присутне су пелтатне и неколико типова капитатних, које се разликују по броју ћелија дршке и њеној дужини (Boix и сар., 2011). Капитатне длаке бројније су од пелтатних, и распоређене су насумично на површини епидермиса. Пелтатне длаке су крупније и чини их глава састављена од осам ћелија, једна базална ћелија и једна крупна ћелија дршке. Излучене супстанце складиште се у простору који настаје одвајањем кутикуле од секреторних ћелија. Хистохемијски тестови у комбинацији са фитохемијским анализама показали су улогу жлезданих длака у производњи липофилних и у екскрецији испарљивих једињења (Boix и сар., 2011).

1.6. Карнозинска киселина – карактеристике и могући кораци у биосинтетском путу

Знајући за све корисне ефекте које поседују жалфија и рузмарин, као и њихови екстракти, у различитим досадашњим студијама детаљније су испитана и дејства појединачних једињења изолованих из ових биљака. У већини случајева, активност екстраката успешно је доведена у директну везу са одређеним једињењима. Тако је показано да се карнозинска киселина, може сматрати најодговорнијом за антиоксидативни ефекат рузмарина и жалфије, а уз то поседује и антиинфламаторна и антиканцерогена својства (Poeckel и сар., 2008; Bauer и сар., 2012; Đilas и сар., 2012; Petiwala и сар., 2013). Даље, установљена су неуропротективна (Fischedick и сар., 2013), антимикробна (Jordán и сар., 2012), антиангинозна (López-Jiménez и сар.,

2013), хепатопротективна (Banna и сар., 2013), антиадипогена (Gaya и сар., 2013) и антихипергликемијска дејства (Kianbakht и Dabaghian, 2013) овог фенолног дитерпена. Уз то, показало се да карнозинска лиселина штити кожу од штетног ултраљубичастох зрачења (Park и сар., 2013) и има позитиван ефекат на липидни профил пацијената оболелих од дијабетеса типа 2 (Kianbakht и Dabaghian, 2013). Већину наведених биолошких активности, карнозинска киселина поседује захваљујући орто-дифенолној структури њеног молекула, и лакој оксидацији хидроксилних група ове структуре (Masuda и сар., 2001). Осим што је присутна у грчкој жалфији и рузмарину, карнозинска киселина је присутна и у великом броју других врста из рода *Salvia* (Pizzale и сар., 2002; Zhou и сар., 2009), затим у врстама *Origanum majorana* (Vági и сар., 2005), *Lepechinia meyeni* и *Lepechinia hastata* (Bruno и сар., 1991).

У самим биљкама, показано је да карнозинска киселина, заједно са токоферолима и каротеноидима, има улогу у заштити фотосинтетичких мембрана хлоропласта од оксидативног оштећења, и обезбеђује додатни начин заштите од интензивног сунчевог зрачења (Munné-Bosch и сар., 1999; Tounekti и сар., 2012). Дехидрогенацијом од карнозинске киселине настаје карнозол, а комбинацијом дехидрогенације и нападом слободног радикала настају високо оксидовани дитерпени као што су розманол или изорозманол (Munné-Bosch и сар., 1999; Munné-Bosch и Alegre, 2000). Карнозинска киселина је, дакле, *каскадни* антиоксидант, при чему производи оксидације бивају даље оксидовани, чиме се повећава значај овог једињења у антиоксидативној заштити. Такође, од карнозинске киселине и изорозманола метилацијом хидроксилне групе фенола настају 12-О-метилкарнозинска киселина и 11,12-ди-О-метилизорозманол, редом. Оваквом метилацијом губи се способност отклањања слободних радикала и повећава се растворљивост једињења (Chang и сар., 1977; Cuvelier и сар., 1996). Метиловани дитерпени се складиште у плазма мембрани где им је улога стабилизација липидних ланаца (Munné-Bosch и Alegre, 2001).



Слика 7. Могући начини биосинтезе карнозинске киселине.

Иако је много тога познато у вези карнозинске киселине, њене структуре и биолошких активности, скоро ништа се не зна у вези начина на који се она синтетише *in vivo*. Биосинтеза дитерпена сродних лабдану увек почиње са два узастопна корака циклизације. Почена циклизација претвара *GGDP*, заједнички прекурсор свих дитерпена, у двоциклични *CDP*. Стереохемију насталог копалил дифосфата одређује стереоспецифичност ензима који катализују циклизацију. Тако, могуће производе циклизације *GGDP* представљају *ent-*, *syn-* и *normal-CDP*, у зависности од дитерпен синтазе класе II која врши синтезу. Производи дитерпен синтаза класе II даље бивају коришћени од стране специфичних дитерпен синтаза класе I, при чему настају специфична полициклична једињења (Peters, 2010). Гао (*Gao*) и сарадници (2009), известили су о функционалној карактеризацији две дитерпен синтазе које синтетишу прекурсоре нордитерпена абиетанског типа, таншинона, у врсти *Salvia miltiorrhiza* (кинеска жалфија). Окарактерисана дитерпен синтаза класе II названа је копалил дифосфат синтаза (SmCDS), и њен производ је *CDP* нормалне стереоизомерије. Други ензим, дитерпен синтаза класе I, названа је „*ent-kaurene synthase-like*“ (SmKSL), а њен производ је милтирадијен (абиета-8,12-диен), који је вероватни прекурсор таншинона (Guo и сар., 2013). Затим, окарактерисани су и ензими CYP76AH1 кинеске жалфије и CYP76AH4 рузмарина, који су такође потенцијално део биосинтетског пута таншинона, и који врше синтезу првог фенолног једињења у ланцу реакција, феругинола (Guo и сар., 2013; Zi и Peters, 2013). Након првих есеја карактеризације, сматрало се да ови ензими који спадају у групу CYP450 ензима функционишу као оксидазе милтирадијена. Међутим, додатни експерименти су показали да синтези феругинола претходи ароматизација милтирадијена при чему настаје абиетатријен (Zi и Peters, 2013), а да окарактерсани CYP450 ензими у ствари функционишу као абиетатријен оксидазе. Реакција ароматизације милтирадијена у абиетатријен лако се одвија спонтаном оксидацијом, мада постоји могућност и да је ензимски катализована у биљкама.

Иако таншинони нису присутни ни у рузмарину, ни у грчкој жалфији, карнозинска киселина представља једињење преко којега се они вероватно синтетишу у врсти *Salvia miltiorrhiza*. То отвара могућност да је биосинтетски пут до карнозинске киселине идентичан код све три наведене врсте, с том разликом што се код рузмарина и грчке жалфије пут на том кораку зауставља, а код *Salvia miltiorrhiza* се наставља све до таншинона.

Интересантно је да је ген за ензим који синтетише милтирадијен (SmMDS) изолован такође и из врсте *Selaginella moellendorffii,* која припада пречицама (Sugai и сар., 2011). Ензим који врши катализу ове реакције припада групи двофункционалних дитерпен синтаза. Филогенетске анализе показале су да је милтирадијен синтаза из *Selaginella moellendorffii* сроднија са двофункционалним дитерпен синтазама скривеносеменица него са SmKSL. Ови резултати указују на могућност да су двофункционалне дитерпен синтазе скривеносеменица настале из двофункционалних дитерпен синтаза ликофита, а да је монофункционална милтирадијен синтаза код врсте *Salvia miltiorrhiza* настала независно из предачких монофункционалних дитерпен синтаза (Sugai и сар., 2011).

Када је у питању даља синтеза карнозинске киселине, неопходни претпостављени кораци јесу једна додатна оксидација бензенског прстена феругинола и оксидација метил групе на позицији 20 до карбоксилне киселине. Редослед ових реакција може бити различит, и не може се са сигурношћу тврдити који је биосинтетски пут правилан, све док сви гени биосинтетског пута и/или одговарајући протеини не буду изоловани и окарактерисани. Међутим, на основу познавања метаболичког профила врста које садрже карнозинску киселину, може се претпоставити преко којих једињења се њена синтеза највероватније одвија. Писиферол, писиферал и писиферинска киселина детектовани су у неколико врста породице Lamiaceae (Bruno и сар., 1991; а Ulubelen и сар., 2001; Fraga и сар., 2005), на основу чега

је веома могућа синтеза карнозинске киселине управо преко ових једињења (Слика 7).

Милтирадијен је први пут описан као ново једињење након изолације гена који кодира његову синтазу у кинеској жалфији, и до сада нису испитиване његове биолошке активности. За разлику од милтирадијена, *ферулинол* је добро познат и широко је распрострањен у биљном царству. Налази се код представника породица Podocarpaceae (Cambie и сар., 1984), Cupressaceae (Sharp и сар., 2001), Verbenaceae (Ono и сар., 1999), Salviniaceae (Li и сар., 2013), Cistaceae (Demetzos и сар., 2002) Asteraceae (Boussaada и сар., 2008) и Pedaliaceae (Clarkson и сар., 2003). Широко је распрострањен и у породици Lamiaceae, посебно у роду *Salvia*, где је детектован код многих врста (Tsutomu и сар., 1983; Ulubelen и Topcu, 1992; Ulubelen и сар., 1994; Tayarani-Najaran и сар., 2013). Значајно је напоменути да је ферулинол такође пронађен и у грчкој жалфији (Topcu и сар., 2013) и рузмарину (Yosr и сар., 2013). Додатне врсте породице Lamiaceae за које се зна да садрже ферулинол су и *Dorystoechas hastata* (Ulubelen и сар., 2004), *Stachys spruneri* (Skaltsa и сар., 2001), *Sphacele chamaedryoides* (Areche и сар., 2009) и *Plectranthus narbatus* (Costa и Nascimento, 2003). За ферулинол је показано да поседује различите биолошке активности. Описана је антифунгална и антибактеријска активност (Muhammad и сар., 1992; Rodríguez и сар., 2006), а такође поседује и гастропротекивна (Rodríguez и сар., 2006; Areche и сар., 2007; Espinoza и сар., 2008) и антиканцерогена својства (Iwamoto и сар., 2003; Son и сар., 2005; Li и сар., 2013; Tayarani-Najaran и сар., 2013). Уз то, ферулинол се може користити као средство за снижавање крвног притиска (Ulubelen и сар., 2000) и за лечење чира на желуцу (Rodríguez и сар., 2006). Поседује и акарицидну (Chang и сар., 2001) и активност против изазивача маларије (*Plasmodium*) (Clarkson и сар., 2003). Најзад, слично карнозинској киселини, ферулинол поседује и антиоксидативна својства (Ono и сар., 1999).

1.7. Улога *EST* секвенционирања у изолацији гена секундарног метаболизма

Како би се искористио велики потенцијал који поседују медицинске биљке, неопходно је познавање начина синтезе секундарних метаболита *in planta*. Идентификација гена различитих биосинтетских путева пружа могућност стварања варијетета са унапређеним приносима или са измењеним метаболичким профилом. Такође, и алтернативни биотехнолошки методи производње на овај начин постају могући.

Секвенционирање транскриптома може нам пружити важне информације о генима потенцијано везаним за секундарни метаболизам. Приликом проучавања биосинтезе секундарних метаболита, веома је битно обратити пажњу на то како су ови процеси регулисани. Постоје два начина регулације — просторна и временска. Неки од секундарних метаболита синтетишу се само у одређеним ткивима или под одређеним околностима, на пример под дејством стресогених фактора спољашње средине (Kliebenstein, 2004). Информације о варијабилности секундарних метаболита пружа нам компаративна метаболомика, уз помоћ које је могуће упоредити метаболичке профиле различитих варијетета или подврста, али такође и различитих ткива биљке. Такође, ова метода нам омогућава праћење промена узрокованих растом у различитим срединским условима. У сваком случају, компаративна метаболика је изузетно корисна за разоткривање биосинтетских путева, јер је најчешће садржај секундарних метаболита одређене биљке или ткива одраз нивоа експресије одговарајућих биосинтетских гена.

Могући су различити приступи за проналажење гена укључених у биосинтезу секундарних метаболита. Један приступ јесте клонирање гена на основу хомологије. Ова метода је била изузетно заступљена у периоду који је претходио развоју геномских технологија, а уз помоћ ње изоловани су гени укључени у синтезу таксола. Ово једињење има антиканцерогени ефекат, а

гени његовог биосинтетског пута изоловани су из *цДНК* библиотека биљака рода *Taxus* (Croteau и сар., 2006). Од тренутка када се ген неког секундарног метаболита идентификује, постаје могуће и клонирање ортолога или хомолога овог гена из сродних врста, користећи стратегију хомологије секвенце. Међутим, ако овакав приступ не даје резултате, или не може да се примени, веома користан приступ јесте и анализа транскриптома, често комбинована са компаративном метаболомиком. Анализа транскриптома данас се одвија уз помоћ техника секвенционирања нове генерације. Резултат секвенционираља су велике количине *EST* (енг. *Expressed sequence tag*) поновака, који су довољне дужине да се могу уклопити у контиге који долазе од истог гена. Често се таквим уклапањем успешно добија информација о читавој дужини гена. Постоје многи примери клонирања гена за биосинтезу различитих секундарних метаболита, почев од терпена (Croteau и сар., 2006), преко фенилпропаноида (Gang и сар., 2002) до алкалоида (De Luca и Laflamme, 2001). Најзад, са развојем техника секвенционирања нове генерације, профилисање транскриптома могуће је обавити економичније и са још бољом покривеношћу. Једна од таквих технологија јесте и *RNA-seq* или *Shotgun Sequencing* целог транскриптома. Недавно, користећи *RNA-seq* приступ, испитан је транскриптом врсте *Camellia sinensis* (чај) (Shi и сар., 2011). Анализа секвенци омогућила је идентификацију већине гена за синтезу секундарних метаболита важних за квалитет чаја, као што су флавоноиди, теанин и кофеин. Још један успешан пример јесте и недавна идентификација две гликозилтрансферазе укључене у синтезу флавоноида код врсте *A. thaliana* (Yonekura-Sakakibara и Hanada, 2011). Са брзим развијањем нових технологија секвенционирања, очекује се све већа улога анализе транскриптома у идентификацији гена биљног секундарног метаболизма, што се посебно односи на врсте које не спадају у модел-организме.

У случају да је позната просторна или временска контрола синтезе секундарног метаболита од интереса, могуће је обавити профилисање транскриптома само из специфичног узорка, било да је у питању посебно

ткиво или узорак подвргнут посебном третману. На овај начин, поређење профила секундарних метаболита и одговарајућих *EST* библиотека сродних врста парадајза (*Solanum esculentum* и *S. habrochaites*), омогућило је брзу идентификацију кључних биосинтетичких гена више различитих сесквитерпена (van Der Hoeven и сар., 2000; Bleeker и сар., 2011). Такође, секвенционирање транскриптома изолованих жлезданих длака, произвело је велике колекције секвенци које су се показале изузетно корисним за идентификацију и карактеризацију гена биосинтетских путева. Све укупно, *EST* секвенционирање жлезданих длака обављено је за 16 различитих биљних врста. Прво *EST* секвенционирање жлезданих длака спроведено је за питому нану (*Mentha* x *piperita*) (Lange и сар., 2000). Резлултат овог пионирског подухвата била је идентификација гена *MEP* пута и пута биосинтезе ментола. Сличан приступ изабран је и за откривање гена секундарног метаболизма у босиљку (*Ocimum basilicum*). *EST* библиотеке су направљене за неколико варијетета босиљка са различитим профилима метаболита (Gang и сар., 2001; Gang и сар., 2002; Davidovich-Rikanati, и сар., 2004; Iijima и сар., 2004), и на основу њих, успешно је идентификовано неколико кључних ензима синтезе монотерпена, сесквитерпена и фенилпропана (Gang и сар., 2002; Gang, и сар., 2002; Iijima и сар., 2004; Iijima и сар., 2004; Koeduka и сар., 2006; Kapteyn и сар., 2007). Такође, *EST* база секвенци жлезданих длака врсте *Cistus creticus* послужила је као вредан извор за изолацију више гена укључених у синтезу терпена, а између осталог на овај начин први пут је окарактерисан ген за синтазу копал-8-ол дифосфата (CcCLS) (Falara и сар., 2008, 2010; Pateraki и Kanellis, 2008, 2010). Током више година велики труд је уложен и у *EST* секвенционирање жлезданих длака парадајза, од стране неколико различитих истраживачких група (van Der Hoeven и сар., 2000; Fridman и Pichersky, 2005; Besser и сар., 2009; Dai и сар., 2010; Bleeker и сар., 2011; McDowell и сар., 2011). Добијене секвенце представљале су корисно средство за расветљавање биосинтетских путева једињења специфичних за жлездане длаке парадајза, као што су метил кетони, (Fridman и сар., 2005; Yu и сар.,

2010), монотерпени (Schilmiller и сар., 2009) и сесквитерпени (van Der Hoeven и сар., 2000; Leonhardt и сар., 2009). Идентификација гена укључених у ране кораке биосинтезе артемизинина такође је била могућа захваљујући *EST* бази секвенци жлезданих длака врсте *Artemisia annua* (Covello и сар., 2007; Covello, 2008; Teoh и сар., 2009).

1.8. Карактеризација функције гена

Након добијања информације о транскриптому неке биљне врсте, следећи корак у расветљавању одређеног биосинтетског пута представља избор гена кандидата и утврђивање функције тих гена. Сама сличност секвенци одређених гена није довољна да се са сигурношћу утврди њихова улога. Разлог томе јесте веома брза еволутивна промена функције гена. Промена само неколико амино киселина у активном месту протеина може често да изазове велике промене у специфичности за одређени супстрат или производ. Такође, честа је и конвергентна еволуција гена, што додатно отежава функционалну карактеризацију гена секундарног метаболизма (Pichersky и Lewinsohn, 2011). *In vitro* биохемијски есеји често се користе за утврђивање функције гена. цДНК гена може бити клонирана и експримирана у одговарајућим организмима домаћинима који затим производе рекомбинантни протеин. Овакав приступ може бити примењен на читаву фамилију гена. На пример, 15 хомологих гена за метил естеразу из врсте *A. thaliana* клонирано је и експримирано у бактерији *E. coli*, што је резултирало производњом рекомбинантних протеина (Yang и сар., 2008). Даље, ови ензими су тестирани на већем броју потенцијалних супстрата путем биохемијских есеја. Иако су у питању биле хомологе секвенце, показало се да се та хомологија структуре не огледа и у хомологији њихове функције. Неке од њих као супстрат су користиле метил индол-3-ацетат, неке метил салицилат, а неке метил јасмонат (Yang и сар., 2008).

Од организама домаћина, за експресију хетерологих протеина најчешће се користи бактерија *Escherichia coli*, али и квасци (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) и дуван (*Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*). Сваки од наведених организама, било да је прокариотски (*E. coli*) или еукариотски (квасци, дуван), одликује се одређеним предностима и недостацима. За избор оптималног експресионог система, неопходно је пре свега узети у обзир карактеристике самог протеина, тј. његову биолошку активност и физичкохемијске карактеристике. Од не мање важности јесте и цена примене сваког од система, једноставност процеса експресије, као и његова сигурност.

До сада најчешће коришћен домаћин за експресију „страних" протеина свакако је бактерија *E. coli*. Предности њеног коришћења јесу брз раст, могућност континуалне ферментације и релативно ниска цена, уз комерцијалну доступност великог броја ћелијских сојева и експресионих вектора. Велики број биљних моно- и сесквитерпен синтаза успешно је експримиранио у *E. coli* и пречишћено за *in vitro* ензимске есеје (Degenhardt и сар., 2009). Такође, хетеролога експресија у *E. coli* примењивана је за испитивање функција различитих дитерпен синтаза. Један од најпознатијих примера јесте карактеризација синтазе таксадиена тисе, једног од прекурсора у биосинтези фармацеутског једињења паклитаксела (Huang и сар., 1998). Још једна дитерпен синтаза окарактерисана коришћењем рекомбинантних сојева бактерије *E. coli* јесте и *Z*-абиенол синтаза дувана (*Nicotiana tabacum*) (Sallaud и сар., 2012). Насупрот наведеним предностима, један од главних недостатака експресије бактерији *E. coli* јесте немогућност ћелија да обављају посттранслационе модификације протеина, што може негативно да утиче на њихову биолошку активност, функцију, структуру, растворљивост и стабилност (Jung и Williams, 1997; Linskens и сар., 1999). Проблем при експресији може претстављати и нестабилност плазмида и кодонска некомпатибилност, као и токсичност синтетисаног протеина.

Пекарски квасац (*S. cerevisiae*) већ 25 година се користи за експресију хетерологих гена (Hitzeman и сар., 1981). Због економске исплативости и безбедности за људску употребу, овај експресиони систем нашао је примену у производњи лекова, као што је вакцина против хепатитиса Б, на пример (DiMiceli и сар., 2006). Квасци са вишим еукариотима деле многе молекулске, генетске и биохемијске карактеристике, а погодни су и за ферментацију на индустријском нивоу, због чега поседују велики комерцијални потенцијал. Због свог богатог ендомембранског система, квасци имају способност секреције синтетисаних протеина у ванћелијски простор. Будући да су квасци једноћелијски еукариоти, у стању су да синтетишу растворљив рекомбинантни протеин, правилне тродимензионалне структуре, и да изврше све неопходне посттранслационе модификације (Daly и Hearn, 2005). Додатно, плазмиди са снажним промоторима су доступни, што олакшава производњу велике количине протеина од интереста. Једна од предности које пружа карактеризација функције протеина у квасцима, јесте и могућност експресије ензима чија је активност везана за унутрашње мембране, као што је ендоплазматични ретикулум или унутрашња мембрана митохондрија (Pompon и сар., 1996). Пример за такве ензиме су и цитохром *P450* монооксигеназе. Постоји значајан број истраживања у којима су дитерпен синтазе успешно синтетисане у квасцима (Engels и сар., 2008; Pateraki и Kanellis, 2008; Kirby и сар., 2010; Hamberger и сар., 2011).

Када се микроорганизми користе као домаћини за експресију биљних протеина, често је неопходно конструисати комплексне путеве за синтезу прекурсора терпена, који не постоје природно у овим ћелијама. Због тога, данас је у широкој употреби привремена експресија протеина у врсти *N. benthamiana*, будући да биљке поседују како *MVA*, тако и *MEP* биосинтетске путеве (Goodin и сар., 2008). Такође, експресија *in planta* омогућава испитивање локализације унутар ћелијских органела. Поступак агроинфилтрације је веома ефикасан код врсте *N. benthamiana*, и у неким случајевима омогућио је производњу велике количине једињења од интереса

(Kapila и сар., 1997; Voinnet и сар., 2003). *N. benthamiana* искоришћена је успешно за производњу две биљне терпен синтазе врсте Artemisia annua (аморфадиен синтаза и епи-цедрол синтаза) (van Herpen и сар., 2010; Kanagarajan и сар., 2012).

Када је у питању карактеризација протеина биосинтетских путева припадника породице Lamiaceae, забележена су успешна коришћења свих описаних система експресије. Експресијом у ћелијама *E. coli*, између осталог, окарактерисан је ензим врсте *Salvia sclarea* који синтетише (*8R*)-хидрокси-*CDP* од *GGDP*, затим 3-карен синтаза врсте *S. stenophylla*, као и маноил синтаза врсте *Coleus forskohlii* (Hoelscher и сар., 2003; Günnewich и сар., 2013; Irini Pateraki и сар., 2014). Експресија у квасцима омогућила је карактеризацију милтирадиен и феругинол синтазе кинеске жалфије (*Salvia miltiorrhiza*), склареол синтазе врсте *S. sclarea*, транс-β-кариофилен врсте *S. fruticosa*, лимонен хидроксилазе нане (Mentha spp.), и других терпен синтаза (Caniard и сар., 2012; Z. Dai и сар., 2012; Guo и сар., 2013). Склареол синтаза је привремено експримирана и у листовима врсте *N. benthamiana* (Caniard и сар., 2012). Међу протеинима синтетисаним у овој врсти налази се и τ-кардинол синтаза лаванде (*Lavandula angustifolia*) (Jullien и сар., 2014).

Есеји функционалне карактеризације протеина секундарног метаболизма, као што су они наведени у претходним примерима, пружају коначни *in vitro* доказ о реакцијама које катализују испитивани ензими и о њиховој специфичности за супстрат или производ.

2

Циљ рада

Основни научни циљ докторске дисертације био је испитивање биосинтезе карнозинске киселине код грчке жалфије (*Salvia fruticosa* Mill.) и рузмарина (*Rosmarinus officinalis* L.), са сврхом идентификације и функционалне карактеризације одговарајућих гена биосинтетског пута, као и развијања алтернативног биотехнолошког поступка за производњу ове вишеструко корисне супстанце у хетерологим системима.

Реализација циљева обухватала је следеће кораке:

- Оптимизација метода за изоловање жлезданих длака грчке жалфије и рузмарина.

- Локализација ткива у коме се одвија синтеза карнозинске киселине анализом хемијског састава изолованих жлезданих длака и листова са укоњеним длакама помоћу *LC-PDA-LTQ-Orbitrap FTMS* методе.

- Оптимизација метода за изоловање нуклеинских киселина из жлезданих длака и из листова са којих су длаке уклоњене.

- Секвенционирање транскриптома грчке жалфије и рузмарина *454 GS FLX Titanium* платформом, коришћењем РНК ткива које се одликује највишом концентрацијом карнозинске киселине.

- Установљавање листе гена потенцијалних учесника у биосинтези карнозинске киселине, поређењем са хомологим секвенцама до сада већ окарактерисаних гена сродних биљних врста.

- Изолација пуне дужине гена кандидата *PCR* техником и клонирање кодирајућих секвенци цДНК у векторе за експресију.

- Функционална карактеризација рекомбинантних протеина у бактеријама (*Echerichia coli*), квасцима (*Saccharomyces cerevisiae*) и дувану (есеји привремене експресије у врсти *Nicotiana benthamiana*).

- Идентификација производа ензимске реакције *GC-MS* анализом и NMR спектроскопијом.

3

Материјал и методе

3.1. Биљни материјал

Биљке врсте *Salvia fruticosa* одгајене су или из семена прикупљених 2009. године од дивљих популација са острва Крит, Грчка (Кавуси-источни део острва, Врисес-западни део) или купљених од произвођача семена (*B & T World Seeds*, *Aigues-Vives*, Француска). Полазни биљни материјал за врсту *Rosmarinus officinalis* представљала су семена пореклом из Солуна, Грчка и купљена од произвођача семена (*B & T World Seeds*, *Aigues-Vives*, Француска). Биљке су гајене у стаклeнику Пољопривредног факултета Аристотеловог универзитета у Солуну (Грчка), под условима контролисане температуре (25/18 °C, дан/ноћ, зима; 32/20 °C, дан/ноћ, лето), уз природни фото период. За испитивање утицаја срединског стреса, биљке су расле под интензивним осветљењем (натријумска сијалица високог притиска – 400 *W*).

3.2. Изолација жлезданих длака

Абразија сувим ледом: Жлездане длаке, које су коришћене као материјал за изолацију гена и анализе њихове експресије, прикупљене су коришћењем модификоване методе „абразија сувим ледом“ (Yerger и сар., 1992). Листови рузмарина уклоњени са биљака стављени су директно у пластичне тубе од 50 *ml* са завртњем, док су листови грчке жалфије претходно исечени на траке ширине 0.5 *cm*. Тако припремљени листови брзо су одложени у контејнер са течним азотом до следећег корака, који је представљао додавање 3 cm^2 фино уситњеног сувог леда. Туба је затим до врха испуњена течним азотом, и подвргнута мешању на вортекс мешалици подешеној на максималну јачину, у трајању од 2 минута, што је омогућило одвајање жлезданих длака са површине листова. Затим је мешавина листова и сувог леда пребачена у цедиљку (величина поре 1.6 *mM*) и профилтрирана како би се одвојиле ослобођене жлездане длаке и суви лед од листова. Одмах затим, издвојене жлездане длаке (заједно са сувим ледом) смештене су у нову тубу. Исто то је урађено и са преосталим листовима. Тубе су враћене у контејнер са течним

азотом, после чега су пребачене на -80 °C. Овај метод био је ефикасан за добијање узорака чистих жлезданих длака, али анализа листова светлосним микроскопом након поступка абразије, показала је ипак да се одређен број длака задржао на површини листа. Због тога је било неопходно применити и додатни корак абразије уз помоћ четкице, како би се добили узорци листова без иједне жлездане длаке. У сврху „чишћења" површине листова од свих длака, коришћена је четкица од синтетичког материјала отпорна на ниске температуре. Током читавог поступка, материјал је био потопљен у течни азот. Листови су на крају испрани етанолом охлађеним у течном азото, како би се у потпуности уклонили сви трагови длака како са абаксијалне, тако и са адаксијалне стране листова. Сав биљни материјал је чуван на -80 ^{o}C до следећег корака.

Абразија стакленим куглицама: За анализу хемијског састава, жлездане длаке су издвојене коришћењем модификоване методе „абразија стакленим куглицама" (Gershenzon и сар., 1992). Листови исечени са биљке потопљени су током 1 *h* у дестиловану воду охлађену ледом, која је садржавала 0,05 % *Tween 20*. После одливања воде, листови су два пута испрани леденом водом и затим подвргнути абразији коришћењем апарата *bead-beater* (*Biospec Products, Bartlesville*, САД). У комору апарата стављен је припремљени биљни материјал, 65 *ml* стаклених куглица (пречника 0.5 *mM*), *XAD-4* смола (1 *g/g* биљног материјала), и екстракциони пуфер охлађен на леду (25 *mM HEPES pH* 7.3, 12 *mM KCl*, 5 *mM* $MgCl_2$, 0.5 *mM* K_2HPO_4, 0.1 *mM* $Na_4P_2O_7$, 5*mM DTT*, 2.4 *g l-1* сахароза, 26.4 *g l-1* D-сорбитол, 6 *g l-1* метил целулоза, and 10 *g l-1* поливинилпиролидон (*PVP*; *Mr* 40,000)) до пуне запремине. Након абразије, жлездане длаке су одвојене од биљног материјала, стаклених куглица и *XAD-4* смоле пропуштањем садржине коморе кроз лабораторијско сито од 250 *μm*. Материјал задржан на ситу је још два пута испиран са 100 *ml* леденог изолационог пуфера (екстракциони пуфер без метил целулозе), са поновним пропуштањем кроз сито након сваког испирања. Профилтрирани пуфер са жлезданим длакама је сакупљен, чему су уследиле филтрације редом кроз

сита од 106 *μm* и 75 *μm*. Филтрат је затим сакупљен у неколико пластичних туба за центрифугирање од 50 *ml*. Жлездане длаке су наталожене центрифугирањем током 2,5 минута на 2500 *rpm*, супернатант је одливен, а талози (жлездане длаке) су пребачене у микротубе од 1.5 *ml* и ускладиштене на -80 °C. Листови су након процеса абразије одвојени од стаклених куглица и *XAD-4* смоле филтрирањем кроз цедиљку (величина поре 1.6 *mM*), пребачени у тубу од 50 *ml* и одложени на -80 °C. Ефикасност уклањања жлезданих длака потврђена је прегледањем узорака под светлосним микроскопом.

3.3. Изолација РНК из жлезданих длака

За изолацију РНК, жлездане длаке и листови без длака су одвојено хомогенизовани у авану, уз додатак течног азота, до финог праха. РНК високог квалитета изолована је коришћењем комерцијалног комплета *Spectrum Plant Total RNA Kit* (*Sigma*, САД), и *PureLink RNA Mini Kit* (*Ambion*, САД) по упутству произвођача. Концентрација добијене РНК одређена је спектрофотометријски, апаратом *NanoDrop ND-1000* (*Thermo Scientific*, САД). Квалитет РНК изоловане за потребе *454* секвенционирања додатно је испитан слањем компанији *Plataforma de Transcriptòmica* (*Parc Cientific de Barcelona* и u*niversitat de Barcelona*, Шпанија) за *S. fruticosa* и компанији *Bioprobe Lp R&D Laboratories* (Солун, Грчка) за *R. officinalis*, на анализу помоћу *Agilent 2100 Bioanalyzer* система (*Agilent Technologies,* САД).

3.4. Електрофоретске технике

3.4.1. Агарозни гел

За раздвајање, идентификовање и пречишћавање фрагмената нуклеинских киселина, коришћени су агарозни гелови различите концентрације (0,8-1,2 %), у 1 % *TAE* пуферу (40 *mM Tris*, 20*mM* сирћетна киселина и 1 *mM EDTA*). ДНК је обојена етидијум бромидом (0.5 *pg/ml*).

3.4.2. *SDS*-гел електрофореза (*SDS*)

За раздвајање и идентификовање синтетисаних протеина, примењена је *SDS* електрофореза. Апарат за електрофорезу (*Bio-Rad*, САД), припремљен је по упутству произвођача. 8 *ml* припремљеног гела за раздвајање (1,6 *ml* 40 % акриламид, 2 *ml* 1,5 M *Tris pH* 8,3, 80 *µl* 10 % *SDS*, 80 *µl* 10 % *APS*, 8 *µl TEMED*, 4,2 *ml* H_2O), пастеровом пипетом је разливено између две стаклене плоче, до отприлике две трећине запремине. Моментално је додат изопропанол да уклони кисеоник са горње површине гела и да изравна његову површину. Након сат времена полимеризације, изопропанол је одливен и горња површина гела испрана је дестилованом водом. Сви трагови воде пажљиво су уклоњени филтер папиром. Затим је припремљено 5 *ml* гела за надслојавање (0,75 *ml* 40 % акриламид,1, 25 *ml* 0,5 M *Tris pH* 6,8, 50 *µl* 10 % *SDS*, 50 *µl* 10 % APS, 5 *µl* TEMED, 4,2 *ml* H_2O), који је преливен преко гела за раздвајање. У гел је затим урођен чешаљ. Након полимеризације од један сат, чешаљ је пажљиво извађен, а формирани бунарићи испрани су дестилованом водом. Плоче су затим постављене у каду за електрофорезу и наливен је 1x *Tris*-глицин електрофоретски пуфер (192 *mM* глицин, 0.1 % *SDS*, 25 *mM Tris HCl*, *pH* подешена на 8.3). Пре сипања протеинских узорака, прво је обављена денатурација коришћењем пуфера за узорке (5 mM *Tris pH* 6,8, 1,5 % *DTT*, 2 % *SDS*, 0,1 % бромофенол плаво, 10 % глицерол). Након додавања пуфера за денатурацију, узорци су инкубирани на 100 °C током 3-5 минута. Протеински узорци су затим охлађени на леду и центрифугирани на 13000 *rpm* током 2 минута. Упоредо са узорцима, коришћен је и молекулски маркер *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (*Fermentas*, САД), за одређивање релативне молекулске масе протеина. Узорци и маркер су сипани у бунариће и електрофореза је рађена на 200 *V*. Након завршетка електрофорезе, гел је пажљиво одвојен од стаклених плоча, испран водом, и стављен у раствор за бојење (0.25 *g Coomassie brilliant bleu R* 250, 10 % сирћетна киселина, 50 % метанол, 40 % H_2O). Након сат времена вишак боје је уклоњен стављањем у раствор за обезбојавање (10 % сирћетна киселина, 50 % метанол, 40 % H_2O).

Процес обезбојавања трајао је од 4 *h* до 16 *h* са неколико мењања раствора за обезбојавање.

3.5. *PCR* амплификација

За изолацију непознатих региона, и за изолацију пуне дужине гена, коришћена је *PCR* техника, уз коришћење *Platinum Taq* полимеразе (*Life Technologies Corporation*, САД) и *Phusion Hot Start Flex DNA* полимеразе (*New England Biolabs*, САД). *Phusion Hot Start Flex* одликује се веома ниском стопом грешака при полимеризацији нуклеотида, тако да је изузетно корисна за изолацију гена чију је функцију потребно испитати. За постављање реакција коришћена су упутства произвођача, а услови појединачних реакција описани су у поглављима који описују клонирање гена кандидата. Након амплификације овим ензимом, настали фрагменти ДНК имали су равне крајеве (енг. *blunt ends*). У случајевима када је након амплификације било планирано *TA* клонирање добијених фрагмената, било је неопходно додати аденинске наставке на 3' крајеве оба ланца ДНК, што је обављено уз помоћ *Taq* полимеразе (*KapaTaq, Kapa biosystems*, САД). У 30 *µl PCR* производа додато је 1 *µl* 10 *mM dNTPs*, 13,8 *µl* стерилне воде и 0,2 *µl KapaTaq* полимеразе. Реакција је инкубирана на 72 °C током 20 минута.

За директно проверавање да ли одређена бактеријска колонија садржи плазмид од интереса, коришћена је *PCR* техника директно на колонијама (енг. *colony PCR*). У ту сврху, у 20 *µl* стерилне воде, у *PCR* микротуби, инокулирана је мала количина бактерија пореклом од једне појединачне колоније. Од те количине, 10 *µl* је даље коришћено за *PCR*, а остатак је сачуван за инокулацију *LB* подлоге колонијом, и за пречишћавање исправног плазмида. За *PCR* реакцију, прво је било неопходно лизирати ћелије како би се плазмид ослободио. То је постигнуто почетним кораком у којем је припремљених 10 *µl* растворених бактерија загревано на 100 °C у трајању од 3 минута, у *PCR* машини. Тек након тога су у *PCR* микротубу додате и остале

компоненте реакције (1x *KapaTaq Buffer B*, 10 *mM dNTPs*, 10 *μM* прајмери, 1,25 *U KapaTaq DNA Polymerase*, дестилована вода до 20 *μl* коначне запремине), на леду. За амплификацију су коришћени прајмери специфични за векторе (Табела 2). Програм амплификације био је следећи: 2 минута на 95 °C, 35 циклуса од 30 °C секунди на 95 °C, 30 секунди на одређеној температури хибридизације (зависно од коришћених прајмера) и 2 минута и 30 секунди на 72 °C и на крају 2 минута на 72 °C. Производи реакције су проверавани на агарозном гелу.

3.6. *TA* клонирање

За *TA* клонирање коришћен је комплет *TA TOPO* (*Life Technologies Corporation*, САД). Производи *PCR* реакције су након додавања аденинских наставака, повезани са плазмидом pCRII, који је линеаран и на својим крајевима има везан ензим топоизомеразу. Током *TOPO* реакције, топоизомераза обухвата крајеве *PCR* производа и на тај начин их уграђује у плазмид. Услови реакције били су следећи: 1,5 *μl PCR* производа инкубирано је 15 минута са 0,5 *μl* раствора соли, 0,5 *μl* вектора pCRII и 0,5 *μl* стерилне воде. Након тога, читава TOPO реакција искоришћена је за трансформацију бактерија *Mach1*.

3.7. Клонирање засновано на рестрикционим ензимима

Рестрикциони ензими препознају и секу специфичне секвенце дволанчане ДНК, због чега се користе као алатка у методологији рекомбинантне ДНК. Након сечења, на крајевима ДНК фрагмената остају кратке једноланчане секвенце, које су „лепљиве“ (енг. *sticky ends*). На одредишни вектор може се такође деловати истим рестрикционим ензимом, па се комплементарни „лепљиви“ крајеви фрагмента и вектора могу спојити помоћу ензима ДНК лигазе. За сврху клонирања рестрикционим ензимима, секвенци прајмера додаје се и одређено рестрикционо место, како би било могуће амплификовану секвенцу исећи и повезати са одређеним вектором.

Клонирање уз помоћ рестрикционих ензима обављено је или директним сечењем производа *PCR* реакције, или пребацивањем секвенце гена из већ постојећег вектора. Ако *PCR* производ није директно сечен, за његово умножавање прво је коришћена техника *TA* клонирања уз помоћ комплета *TA TOPO* (*Life Technologies Corporation*, САД), што је подразумевало клонирање у вектор pCRII, трансформацију бактерија *E. coli* и проверу исправности клонирања секвенционирањем. Тек након тога, из pCRII вектора, ген је исечен и пребачен у жељени вектор за експресију.

Рестрикционо сечење такође је коришћено и за потврду успешности клонирања, тј. уметања жељеног фрагмента у вектор.

Рестрикциони ензими	**пуфер**	***BSA***
BamHI x EcoRI	*NEBuffer 4*	да
BamHI x MfeI	*NEBuffer 4*	не
BamHI x NotI	*NEBuffer 4*	да
BamHI x XhoI	*NEBuffer 4*	да
EcoRI x NotI	*NEBuffer 4*	да
EcoRI x XbaI	*NEBuffer 4*	да
HindIII x BamHI	*NEBuffer 4*	не
HindIII x BglII	*NEBuffer 2*	не
HindIII x ClaI	*NEBuffer 4*	да
MfeI x NotI	*NEBuffer 4*	да
NheI x HpaI	*NEBuffer 4*	да
XbaI x BamHI	*NEBuffer 4*	да
XbaI x BglII	*NEBuffer 2*	не
XbaI x HpaI	*NEBuffer 4*	да

Табела 1. Услови рестрикционих реакција (коришћени пуфери и неопходност додавања *BSA*).

Рестрикционо сечење у сврху клонирања обављено је истовремено са оба рестрикциона ензима (енг. *double digest*). Рестрикциона реакција обично је садржавала 20 *ng/µl* ДНК, 1x *BSA* (ако је било неопходно за дати ензим), 1x

пуфер рестрикционог ензима (*NEBuffer 2* или *4*), 5-10 *U* сваког рестрикционог ензима на сваки *μg* ДНК, у 30 или 50 *μl* коначне запремине реакције. Појединости везане за услове рестрикционих реакција дате су у табели 1, а парови ензима коришћени за сечење фрагмената ДНК и одредишног вектора наведени су у табели 5. Инкубација са ензимом на температури од 37 °C трајала је сат времена када су секвенце припремане за лигацију, и 15 минута за проверу успешности клонирања. Фрагменти су након сечења раздвајани уз помоћ агарозног гела, и пречишћавани за потребе даљих корака лигације.

3.8. Пречишћавање из агарозног гела

За пречишћавање жељеног фрагмента из агарозног гела, коришћен је комплет *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (*Macherey und Nagel*, Немачка), по упутству произвођача. На овај начин пречишћавани су како фрагменти ДНК после дигестије, тако и производи *PCR* реакција.

3.9. Спајање вектора и фрагмента ДНК

Како би се одредила концентрација ДНК фрагмента и вектора након дигестије, извршена је квантификација на гелу, поређењем са ДНК маркером познатих концентрација трака (*Lambda DNA/HindIII Marker, Fermentas*, САД). Спајање жељеног фрагмента ДНК са вектором обављено је инкубирањем ДНК фрагмента са линеаризованим вектором у присуству 1x пуфера и 1 *μl* ДНК лигазе (*T4 DNA ligase, NEB*, САД) у 20 *ml* реакције. Бројни однос молекула плазмида према молекулу фрагмента био је 1:3, а количина вектора најчешће 20 *ng* у рекцији запремине 20 *ml*. Инкубација је обављана на 16 °C током 16 *h*. Такође је као контрола постављана и идентична реакција са изостављеним ДНК фрагментом. 5 *μl* реакције је сутрадан коришћено за трансформацију компетентних ћелија. По појави колонија, исте су инокулиране у 5 *ml* течне *LB* подлоге са одговарајућим антибиотиком, и остављене да инкубирају преко ноћи. Успешност лигације проверавана је или

PCR техником директно на колонијама, или изолацијом плазмида и сечењем рестрикционим ензимима.

3.10. Трансформација бактерија *Escherichia coli*

Компетентне ћелије: За потребе клонирања коришћене су комерцијалне компетентне *Mach1 E. coli* ћелије (*Life Technologies Corporation*, САД), а такође је коришћен и метод припреме компетентних ћелија у лабораторијским условима. Поступак је био следећи: 5 *ml LB* подлоге инокулирано је *Mach1* ћелијама, и затим су ћелије остављене да инкубирају на 37 °C преко ноћи. Након 14-16 *h*, 100 *ml* загрејане *LB* подлоге инокулирано са 1 *ml* преконоћне културе, и настављена је инкубација на 37 °C до OD_{600}~0,2. Затим је подлога са ћелијама подељена у две пластичне епрувете од 50 *ml*, и раст ћелија је заустављен хлађењем на леду у трајању од 20 минута. Након тога су културе центрифугиране на 4 °C, на 4000 *rpm* у тајању од 10 минута. Супернатант је одливен, и у сваку епрувету је додато 25 *ml* пуфера (50 *mM* $CaCl_2$, 15 % глицерол, 10 *mM MOPS pH* 6,6). Епрувете су опет инкубиране на леду 20 минута, и центрифугиране на исти начин. Након одливања супернатанта, у сваку епрувету је додато 4 *ml* охлађеног пуфера. По 100 *µl* овако припремљених ћелија је аликвотирано у микротубе од 1,5 *ml*, и брзо убачено у контејнер са течним азотом ради тренутног замрзавања. Компетентне ћелије припремљене на овај начин чуване су на -80 °C до употребе.

Трансформација: Микротуба са 100 *µl* компетентних ћелија је држана на леду до првих знакова отапања. 10-100 *ng* ДНК је затим додато и ћелије су инкубиране на леду током 30 минута. Ћелије су подвргнуте топлотном удару трајања 45 секунди на 42 °C у воденом купатилу и затим инкубиране на леду два минута. Након тога је у микротубу додато 300 *µl LB* или *SOC* (*Life Technologies Corporation*, САД) течне подлоге и ћелије су инкубиране на 37 °C током 1 *h*. 50-100 *µl* ћелија је засејано на Петри шољу са *LB*-агар подлогом и

одговарајућим антибиотиком. Петри шоље су остављене да инкубирају на 37 °C пеко ноћи, до појаве колонија.

3.11. Изолација плазмида из бактерија

Плазмиди су изоловани из бактерија коришћењем комплета *NucleoSpin Plasmid* (*Macherey und Nagel*, Немачка), по упутству произвођача. Концентрација изолованих плазмида одређена је спектрофотометријски, апаратом *NanoDrop ND-1000* (*Thermo Scientific*, САД).

3.12. Хранљиве подлоге

Лурија-Бертани (*LB*) подлога:

1 % (w/v) *NaCl*, 1 % (w/v) пептон, 0.5 % (w/v) екстракт квасца. За припрему чврсте *LB* подлоге, наведеној мешавини је додато 2 % (w/v) агара по подешавању *pH* на 5.8-6.2. Подлога је аутоклавирана под стандардним условима (20 минута на температури од 121 °C). Антибиотици су додати у подлогу охлађену на 55 °C. Након хлађења, подлоге су чуване на 4 °C.

YPD подлога**:**

1 % (w/v) екстракт квасца, 2 % (w/v) пептон, 2 % (w/v) глукоза. За чврсту подлогу, *pH* је подешена на 5.8-6.2. Агар је коришћен у концентрацији од 2 % (w/v). Подлога је аутоклавирана под стандардним условима (20 минута на температури од 121 °C).

Glu/CM (*Complete minimal*) подлога:

0.13 % (w/v) *dropout* прашак, 0.67 % (w/v) *YNB* (*yeast nitrogen base*) без амино киселина, 2 % (w/v) глукоза. За чврсту подлогу, *pH* је подешена на 5.8-6.2, и коначна концентрација агара била је 2 % (w/v). *Glu/CM* садржи све амино киселине неопходне за раст квасца, и користи се као подлога за селекцију. Изостављање једне или више амино киселина из *dropout* прашка

омогућава селекцију само оних ћелија које су трансформисане одговарајућим плазмидима.

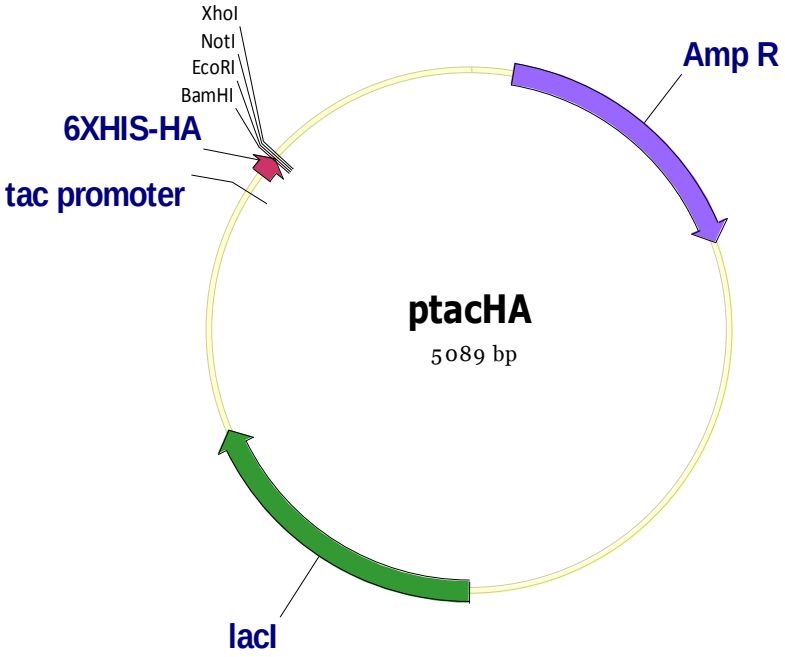
3.14. Изолација и функционална карактеризација гена

3.14.1. Експресиони вектори

Напомена: вектори ptacHA, pUTDH3myc, pHTDH3myc, pWTDH3myc и pYX143 описани у наставку добијени су љубазношћу др Антониоса Макриса.

Бактеријска експресија:

- ptacHA вектор за експресију у бактерији *E. coli* (Слика 8), конструисан је модификацијом pGEX плазмида (*Pharmacia*, САД). Поседује *tac* промотер чија је експресија под контролом *lacI* гена, који је у такође у саставу плазмида. Индукција *lacI* гена се врши једињењем *IPTG*. У саставу плазмида ptacHA налази се и секвенца која кодира за низ хистидина на крају синтетисаног протеина, као и хемаглутининска „етикета“ (*HA-tag*) за имунодетекцију.



Слика 8. Мапа плазмида ptacHA, коришћеног за експресију у бактерији *E. coli*.

Експресија у квасцима:

- pUTDH3myc вектор коришћен је за конститутивну експресију протеина од интереста у *S. cerevisiae*. Експресијом руководи промотер *TDH3* који је додатно спојен са myc етикетом. Садржи и *URA3* (урацил) ген за селекцију у квасцима и ген за отпорност на ампицилин (*AmpR*) за селекцију у *E. coli*. Такође, у саставу плазмида се налази и *2μ* место почетка репликације за интензивно умножавање унутар ћелије (Слика 9).

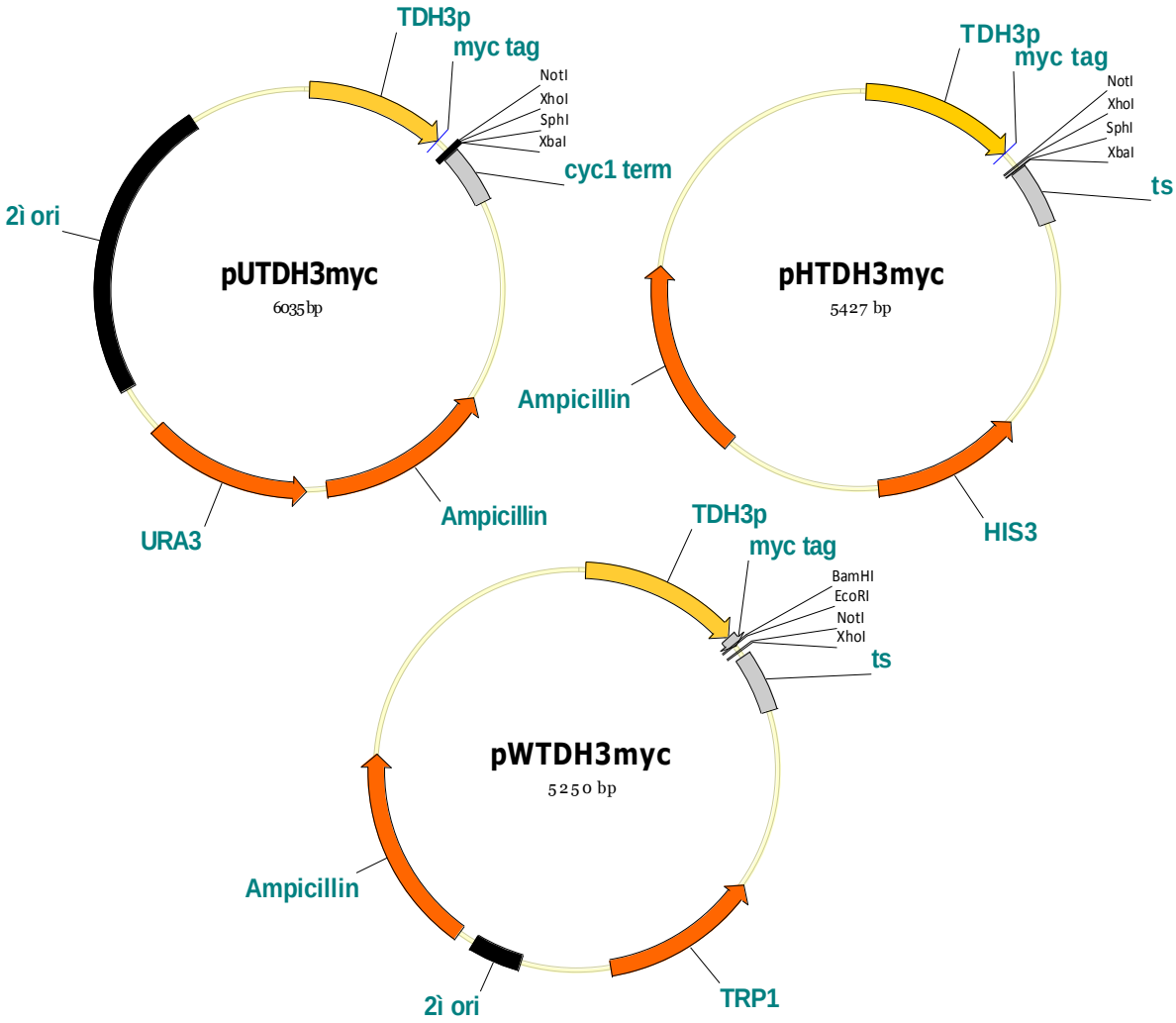
- pHTDH3myc вектор по свему је био исти као и pUTDH3myc, осим што је селекција у квасцима била обезбеђена геном *HIS3* (хистидин) (Слика 9).

- pWTDH3myc био је сличне структура као за претходна два вектора, а селекција у квасцима била је обезбеђена *TRP1* (триптофан) геном (Слика 9).

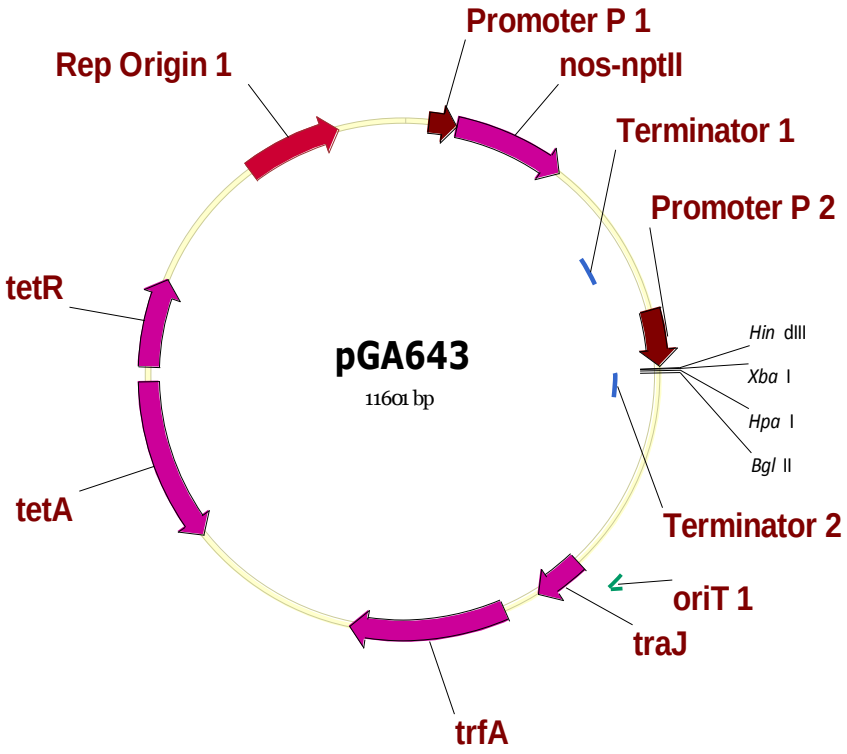
- pYX143 вектор такође је коришћен за за експресију у *S. cerevisiae*. Експресија се одвијала под контролом конститутивног промотера *TPI*, а за селекцију у квасцима овај вектор поседовао је ген *LEU2* (леуцин).

Експресија у *N. benthamiana*:

- pGA643 бинарни вектор коришћен је за есеје привремене експресије у *N. benthamiana*. Вектор се састојао од *CaMV 35S* промотора, *nos* терминатора транскрипције врсте *Agrobacterium tumefaciens* и гена за отпорност на тетрациклин *tetR* (An и сар., 1989) (Слика 10).



Слика 9. Мапе плазмида pUTDH3, pHTDH3 и pWTDH3, коришћених за експресију у квасцима.



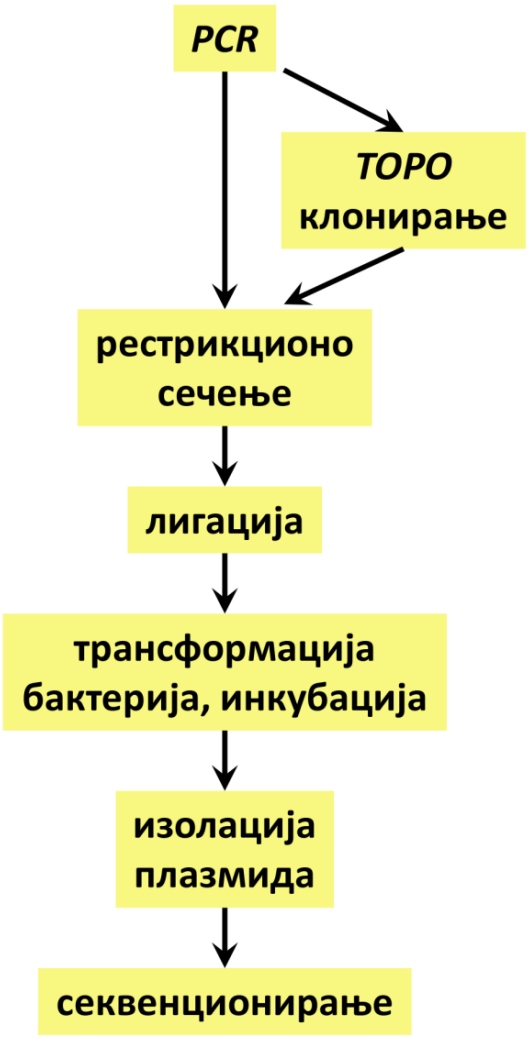
Слика 10. Мапа плазмида pGA643, коришћеног за експресија у *N. benthamiana*.

Табела 2. Секвенце вектор-специфичних прајмера, коришћених за потврду правилне интеграције инсерта секвенционирањем и *PCR* техником на колонијама.

Назив вектора	**Назив прајмера**	**Секвенца прајмера**
ptacHA	*ptacEX for*	5'-TTCTGAAATGAGCTGTTGAC-3'
	T7 Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
pUTDH3, pHTDH3, pWTDH3	*TDH3 seq*	5'-ATTGTAATTCTGTAAATCTA-3'
	cyc1 seq	5'-CGTGAATGTAAGCGTGACATAA-3'
pGA643	*For pGA643*	5'-TAAGGGATGACGCACAATCCC-3'
	Rev pGA643	5'-TTATATCAGCTGGTACATTGCCG-3'
pCRII	*M13UF*	5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'
	M13UR	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

3.14.2. Клонирање гена

Поступак клонирања гена приказан је на слици 11. Општи услови реакција које чине појединачне кораке процеса клонирања (*PCR* амплификација, пречишћавање нуклеинских киселина, сечење рестрикционим ензимима, лигација, трансформација бактеријских ћелија и провера исправности клонирања) дати су у поглављима 2.5-2.11. Појединости везане за клонирање изолованих генских секвенци дати су у наставку.



Слика 11. Кораци процеса клонирања.

3.14.2.1. Клонирање цДНК потенцијалне терпен синтазе SfCPS

EST анализом цДНК библиотеке жлезданих длака листова биљке *S. fruticosa* пронађен је контиг 195, хомолог копалил дифосфат синтазама. Овај контиг није садржавао 5' крај гена. У циљу функционалне карактеризације гена приступљено је изолацији пуне дужине цДНК те потенцијалне копалил дифосфат синтазе која је названа SfCPS.

Клонирање 5' краја цДНК: Први корак у изолацији 5' краја цДНК било је извођење *PCR* технике на цДНК библиотеци као матрици, коришћењем прајмера конструисаног на основу секвенце плазмида цДНК библиотеке (*M13F*: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') и прајмера специфичног за контиг 195 (*04_K19_R*: 5'-CTTGAGTTCTATCAGGTTCAAATATGGTTGCTG-3'). Услови *PCR* реакције су били следећи: 1 *ng* плазмидне ДНК, 1.5 *mM* $MgCl_2$, 0,8 *mM dNTPs*, 2 *μM* прајмера *M13F*, 2 *μM* прајмера *04_K19_R*, 1 *U Platinum Taq* полимеразе (*Life Technologies Corporation*, САД), 1x *PCR* пуфера, према следећем програму: 2 минута на 94 °C, 35 циклуса од 30 секунди на 94 °C, 30 секунди на 55 °C и 2 минута и 30 секунди на 72 °C, и на крају 7 минута на 72 °C. Производ амплификације је клониран у pCRII вектор и секвенциониран. Утврђено је успешно изоловање додатног дела секвенце гена, с тим што је и даље мали део 5' краја цДНК остао непознат, због чега је настављено са покушајима изолације. Други корак изолације 5' краја цДНК било је извођење 5' *RACE* технике на цДНК изолованој из жлезданих длака биљке *S. fruticosa* као матрици. Синтеза цДНК и *PCR* реакције обављене су коришћењем *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* комплета (*Life Technologies Corporation*, САД), на 1 *μg* РНК жлезданих длака. За реверзну транскрипцију коришћен је прајмер специфичан за ген (*5CopR172_GSP1*: 5'-CGGCGTTCTCGATGAATTTCAAGC-3'), а синтетисана цДНК је обележена dC репом коришћењем компоненти комплета. *PCR* реакција је изведена из два круга, коришћењем прајмера *RACE* комплета и прајмера специфичних за ген (први круг- *5CopR140_GSP2*: 5'-TCATCTTTGGTCTTCATGAACACCTGG-3';

други круг- *5CopR83_GSP3*: 5'-GCCATCGCCTGACTGCAGTTTCAGAATC-3'). Као матрица за други круг *PCR* реакције коришћен је 1 *μl* реакционе смеше прве *PCR* амплификације. Услови реакције били су исти као у случају *PCR* амплификације коришћењем цДНК библиотеке.

Изолација пуне дужине гена обављена је на цДНК изолованој из жлезданих длака, коришћењем директног (*SfCopS-5BamHI_0*: 5'-GGATCCATGACCTCTATGTCCTCTC-3') и реверзног прајмера (*SfCopS-3MfeI*: 5'-CAATTGTCATACGACCGGTCCAAAGAG-3'), који су били конструисани тако да у себи садрже и рестрикциона места за клонирање у бактеријски и експресиони вектор квасца. Услови *PCR* реакције су били следећи: 150 *ng* цДНК, 1.5 *mM MgCl2*, 0,8 *mM dNTPs*, 2 *μM* прајмера *SfCopS-5BamHI_0*, 2 *μM* прајмера *SfCopS-3MfeI*, 1 *U Platinum Taq* полимеразе, 1x *PCR* пуфера, према следећем програму: 2 минута на 94 °C, 35 циклуса од 30 °C секунди на 94 °C, 30 секунди на 55 °C и 3 минута и 30 секунди на 72 °C и на крају 7 минута на 72 °C. Такође, изолована је и „скраћена" секвенца цДНК гена коришћењем директног прајмера (*SfCopS-5BamHI_91*: 5'- GGATCCGCATGCGCATGGCTGAA-CAG-3') који је почињао од 91. нуклеотида отвореног оквира читања гена (енг. *Open reading frame*, скраћено *ORF*), под истим условима *PCR* реакције. Предвиђање дужине транзитног пептида за конструисање „скраћене" секвенце цДНК обављено је уз помоћ *TargetP 1.1* алгоритма (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/).

Све секвенце су након амплификације клониране у pCRII вектор за клонирање након чега су конструкти pCRII-*SfCPS* (пуна дужина гена) PCRII-*SfCPSm* („скраћена" секвенца) секвенционирани у циљу провере исправности клонирања.

Клонирање у експресионе векторе:

Бактеријска експресија: Плазмид ptacHA је коришћен за функционалну карактеризацију у бактерији *E. coli*. „Скраћена“ секвенца цДНК гена пребачена је лигацијом уз помоћ *T4 DNA* лигазе из PCRII вектора коришћењем рестрикционих ензима BamHI и MfeI/EcoRI. Исправност новонасталог конструкта ptacHA-*SfCPSm* проверена је секвенционирањем.

Експресија у квасцима: Рестрикционим ензимима BamHI и NotI „скраћена“ секвенца цДНК исечена је из конструкта ptacHA-*SfCPSm* и пребачена у pUTDH3мус плазмид лигацијом уз помоћ *T4 DNA* лигазе, чему је уследила провера конструкта pUTDH3-*SfCPSm* помоћу секвенционирања.

Есеј привремене експресије у врсти *Nicotiana benthamiana*: За клонирање пуне дужине цДНК у експресиони плазмид pGA643 употребљена је техника *PCR* амплификације, при чему је као матрица послужио PCRII-*SfCPS* конструкт. Амплификација је обављена директним (*SfCDS full HindIII 5'*: 5'-GCATGAAAGCTTATGACCTCTATGTCCTCTCTAAAT-3') и реверзним (*SfCDS full BglII 3'*: 5'- GCATGAAGATCTTCATACGACCGGTCCAAAGAG-3') прајмером. Услови *PCR* реакције су били следећи: 1 *ng* плазмидне ДНК, 200 *μM dNTPs*, 0,5 *μM* прајмера *SfKS full HindIII 5'*, 0,5 *μM* прајмера *SfKS full BglII 3'*, 1 *U Phusion Hot Start Flex DNA* полимеразе (*New England Biolabs*, САД) и 1x *Phusion HF* пуфера, према следећем програму: 30 секунди на 98 °C, 32 циклуса од 10 °C секунди на 98 °C, 30 секунди на 61 °C и 1 минут на 72 °C и на крају 10 минута на 72 °C. Након амплификације, уследила је дигестија *PCR* производа рестрикционим ензимима HindIII и BglII. Такође је и плазмид pGA643 припремљен дигестијом истим ензимима, након чега је уследило повезивање секвенци *T4* лигазом и коначно потврда успешности клонирања секвенционирањем.

3.14.2.2. Клонирање цДНК потенцијалне терпен синтазе SfKSL

EST анализом цДНК библиотеке жлезданих длака листова биљке *S. fruticosa* пронађен је контиг 66 хомолог каурен синтазама. Овај контиг није садржавао 5' и 3' крај гена. У циљу функционалне карактеризације гена приступљено је изолацији пуне дужине цДНК те потенцијалне каурен синтазе која је названа SfKSL.

Клонирање 5' и 3' краја цДНК: Изолација 5' и 3' краја цДНК извршена је помоћу *PCR* технике на цДНК библиотеци као матрици, коришћењем прајмера конструисаних на основу секвенце плазмида цДНК библиотеке (*M13F*: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' и *pDNRLib reverse 2*: 5'-CTCCTAGGGAAACAGCTATGACCATGTTC-3') и прајмера специфичног за контиг 66 (*424_02_A10F*: 5'-GATATATTTTTGGAGGTTGGTAAGGCT-3'и *RCA02_A10_R*: 5'-CCATCGCTCCATGTGTCTAATTCTATCTTG-3'). Услови *PCR* реакције су били следећи: 1 *ng* плазмидне ДНК, 1.5 *mM* $MgCl_2$, 0,8 *mM dNTPs*, 2 *μM* прајмера библиотеке, 2 *μM* прајмера специфичног за ген, 1 *U Platinum Taq* полимеразе, 1x *PCR* пуфера, према следећем програму: 2 минута на 94 °C, 35 циклуса од 30 °C секунди на 94 °C, 30 секунди на 55 °C и 2 минута и 30 секунди на 72 °C и на крају 7 минута на 72 °C. Производ амплификације је клониран у pCRII вектор и секвенциониран. Резултати секвенционирања су показали да изоловани 5' и 3' крајеви гена не припадају контизи 66, већ њеном паралогу. Због велике сличности новоизоловане секвенце са каурен синтазама, одлучено је да се настави са изолацијом пуне дужине њене цДНК. Конструисани су прајмери за изолацију (*5SfKaurSfull(BamHI)*: 5'-GGATCCATGCTTCTTACCTTCAACATCACC-3' и *SfKaurS_3_XhoI*: 5'-CTCGAGCTATTCTCCAACGGGCTCATA-3'), а као матрица је коришћена на цДНК изолована из жлезданих длака. Прајмери су у себи садржавали места за клонирање у бактеријски и експресиони вектор квасца. Услови *PCR* реакције су били следећи: 150 *ng* цДНК, 1.5 *mM* $MgCl_2$, 0,8 *mM dNTPs*, 2 *μM* прајмер *5SfKaurSfull(BamHI)*, 2 *μM* прајмер *SfKaurS_3_XhoI,* 1 *U Platinum Taq*

полимераза, 1x *PCR* пуфер, према следећем програму: 2 минута на 94 °C, 35 циклуса од 30 °C секунди на 94 °C, 30 секунди на 55 °C и 3 минута и 30 секунди на 72 °C и на крају 7 минута на 72 °C. Такође, изолована је и „скраћена“ секвенца цДНК гена коришћењем директног прајмера који је почињао од 148. нуклеотида *ORF*-а (*SfKaurS_BamHI_147*: 5'-GGATCCACTCCTCCAACTGATTTG-3'), под истим условима *PCR* реакције као и за изолацију пуне дужине гена. Предвиђање дужине транзитног пептида за конструисање „скраћене“ секвенце цДНК обављено је уз помоћ *TargetP 1.1* алгоритма.

Све секвенце су након амплификације клониране у pCRII вектор након чега су конструкти pCRII-*SfKSL* (пуна дужина гена) и pCRII-*SfKSLm* („скраћена“ секвенца) секвенционирани у циљу провере исправности клонирања.

Конструисање експресионих вектора:

Бактеријска експресија: Плазмид ptacHA је коришћен за функционалну карактеризацију у бактерији *E. coli*. „Скраћена“ секвенца цДНК гена пребачена је лигацијом уз помоћ *T4 DNA* лигазе из pCRII-*SfKSLm* вектора коришћењем рестрикционих ензима BamHI и XhoI. Исправност новонасталог конструкта ptacHA-*SfKSLm* проверена је секвенционирањем.

Експресија у квасцима: Рестрикционим ензимима BamHI и XhoI „скраћена“ секвенца цДНК исечена је из конструкта ptacHA-*SfKSLm* и пребачена у *pH*TDH3myc плазмид лигацијом уз помоћ *T4 DNA* лигазе, чему је уследила провера конструкта *pH*TDH3- *SfKSLm* помоћу секвенционирања.

Есеј привремене експресије у врсти *Nicotiana benthamiana*: За клонирање пуне дужине цДНК у експресиони плазмид pGA643 употребљена је техника *PCR* амплификације, при чему је као матрица послужио pCRII-*SfKSL* конструкт. Амплификација је обављена директним (*SfKS full HindIII 5'*: 5'-

GCATGAAAGCTTATGCTTCTTACCTTCAACATCACC-3') и реверзним (*SfKS full BglII 3'*: 5'- GCATGAAGATCTCTATTCTCCAACGGGCTCATA-3') прајмером. Услови *PCR* реакције су били следећи: 1 *ng* плазмидне ДНК, 200 *μM dNTPs*, 0,5 *μM* прајмера *SfKS full HindIII 5'*, 0,5 *μM* прајмера *SfKS full BglII 3'*, 1 *U Phusion Hot Start Flex DNA* полимеразе и 1x *Phusion HF* пуфера, према следећем програму: 30 секунди на 98 °C, 32 циклуса од 10 °C секунди на 98 °C, 30 секунди на 66 °C и 1 минут на 72 °C и на крају 10 минута на 72 °C. Након амплификације, уследила је дигестија *PCR* производа и рестрикционим ензимима HindIII и BglII. Такође је и плазмид pGA643 припремљен дигестијом истим ензимима, након чега је уследила лигација и коначно потврда успешности клонирања секвенционирањем.

3.14.2.3. Клонирање цДНК потенцијалних цитохрома *P450*

За све потенцијалне цитохром *P450* гене, *454* секвенционирање пружило је информацију о комплетном *ORF* региону, тако да је било могуће одмах приступити изолацији пуне дужине гена из цДНК жлезданих длака. Једини изузетак су била два контига, *Sfru.N01.C016156* и *Sfru.N01.C021415*, за које су анализе поређења са секвенцама из *NCBI* базе података показале да највероватније представљају 5' и 3' крај једног истог гена. На основу региона око START кодона контига *Sfru.N01.C016156* конструисан је директни, а на основу региона око STOP кодона контига *Sfru.N01.C021415*, конструисан је реверзни прајмер. У табели 3 су приказане све изоловане секвенце и назначено је у који плазмид је сваки од гена клониран за испитивање експресије. Звездицом је обележено клонирање обављено од стране др Антониоса Макриса.

Табела 3. Изоловани цитохром *P450* кандидати грчке жалфије и рузмарина, са назнаком у који одредишни вектор су клонирани.

*клонирање обавио др Антониос Макрис

врста	Полазни *EST* контиг	Анотација изоловане секвенце	клонирање
S. fruticosa	*Sfru.N01.C007784/85*	*CYP71AxSf3*	pWTDH3myc, pGA643
		CYP71AxSf4	pWTDH3myc
	Sfru.N01.C002897	*CYP71AxSf1*	pWTDH3myc, pGA643
	Sfru-N01.C005075	*CYP71AySf1*	pWTDH3myc*, pGA643
	Sfru.N01.C005693	*CYP72AxSf1*	pWTDH3myc*, pGA643
	Sfru.N01.C007652/53	*CYP96xSf2*	pWTDH3myc, pGA643
		CYP96xSf3	pWTDH3myc*
	Sfru.N01.C012726	*CYP96xSf1*	pWTDH3myc*, pGA643
	Sfru.N01.C013081	*CYP72xSf1*	pWTDH3myc*, pGA643
	Sfru.N01.C001944	*CYP71DSf2*	pWTDH3myc*
		CYP71DSf3	pWTDH3myc*
	Sfru.N01.C002373	*CYP71ASf1*	pWTDH3myc*
		CYP71ASf4	pWTDH3myc*
	Sfru.N01.C008404	*CYP72AxSf2*	pWTDH3myc*
	Sfru.N01.C016156/Sfru.N01.C021415	*CYP76AAxSf2*	pWTDH3myc, pGA643
R. officinalis	*Roff.N01.C033986*	*CYP71AxRo1*	pWTDH3myc, pGA643
	Roff.N01.C034529	*CYP71AyRo1*	pWTDH3myc, pGA643
	Roff.N01.C034470	*CYP72AxRo4*	pWTDH3myc, pGA643
	Roff.N01.C034550	*CYP72AxRo2*	pWTDH3myc, pGA643
	Roff.N01.C034293	*CYP96xRo1*	pWTDH3myc, pGA643
	Roff.N01.C034476	*CYP96xRo2*	pWTDH3myc, pGA643
	Roff.N01.C027381/82	*CYP72xRo1*	pWTDH3myc, pGA643
	Roff.N01.C021640	*CYP76AAxRo3*	pWTDH3myc, pGA643
	Roff.N01.C021643	*CYP76AAxRo4*	pWTDH3myc, pGA643

Изолација цитохрома *P450* обављена је коришћењем цДНК жлезданих длака грчке жалфије и рузмарина, уз помоћ 1 *U Phusion Hot Start Flex DNA* полимеразе, и уз додатак 200 *μM dNTPs*, 0,5 *μM* директног прајмера, 0,5 *μM* реверзног прајмера и 1x *Phusion HF* пуфера. Секвенце прајмера наведене су у табели 4, а *PCR* амплификација обављена је уз коришћење следећег програма: 30 секунди на 98 °C, 32 циклуса од 10 °C секунди на 98 °C, 30 секунди на одговарајућој температури хибридизације и 1 минут на 72 °C и на

крају 10 минута на 72 °C. За клонирање у вектор за експресију у квасцима, pWTDH3myc, амплификоване секвенце гена су прво клониране у pCRII вектор и секвенциониране, након чега су секвенце гена пребачене у одредишни вектор рестрикционим клонирањем. У случају клонирања у бинарни вектор pGA643, за привремену експресију у *N. benthamiana,* примењена је метода директне дигестије *PCR* производа, након чега је следила лигација са одредишним вектором и секвенционирање. Након потврде исправности конструкта, исти су трансформисани даље у одговарајуће сојеве микроорганизама (сојеви квасаца *AM104* и AM113 су трансформисани конструктима на бази pWTDH3myc вектора, а *A. tumefaciens* GV3101 је трансформисан конструктима на бази pGA643 вектора).

3.14.3. Конструисање вектора за експресију у квасцима за гене *RoCPS* и *RoKSL1*

RoCPS и *RoKSL1* гени су амплификовани са вектора pICH41083-*RoCPS* и pICH41083-*RoKSL1* (добијени од др Алана Тисијеа (*Alain Tissier*), Институт за биохемију биљака, Лајбниц, Немачка). Секвенце су клониране и у својој пуној дужини (*RoCPSf* и *RoKSL1f*) и као „зреле“ верзије, без транзитног пептида (*RoCPSm* и *RoKSL1m*). Дужина транзитног пептида за *RoCPS* и *RoKSL1* гене, одређена уз помоћ *TargetP 1.1* алгоритма, износила је 67 и 46 амино киселина, редом. Следећи прајмери, који су садржавали рестрикциона места, коришћени су за амплификацију: *RoCPS full BamHI For*: 5'-GCATGAGGATCCATGACCTCTAT GTCCTCTCTAAATTTG-3' (за пуну дужину *RoCPS*), *RoCPS mat BamHI For*: 5'-GCATGAGGATCCATGGCGTCACAAGT-GAGTGAAAAAGG-3' (за „зрели“ *RoCPS*), *RoCPS NotI Rev*: 5'-GCATGAGCGGCCGCTTCATACGACCGGTCCAAACAG-3', *RoKSL1 full BamHI For*: 5'-GCATGAGGATCCATGTCTCTCGCCTTCAACC-3' (за пуну дужину *RoKSL1*), *RoKSL1 mat BamHI For*: 5'-GCAT GAGGATCCATGTGCAACCTTA-CTACAACAGATTTG-3' (за „зрели“ *RoKSL1*) и *RoKSL1 NotI Rev*: 5'-GCATGAGCGGCCGCTTCATTTGCCACTCACTTTTTTG-3'. Услови *PCR* реакције

су били следећи: 1 *ng* плазмидне ДНК, 200 *μM dNTPs*, 0,5 *μM* директног прајмера, 0,5 *μM* реверзног прајмера, 1 *U Phusion Hot Start Flex DNA* полимеразе и 1x *Phusion HF* пуфера, према следећем програму: 30 секунди на 98 °C, 25 циклуса од 10 °C секунди на 98 °C, 30 секунди одређеној температури хибридизације и 1 минут и 15 секунди на 72 °C и на крају 10 минута на 72 °C. Температуре хибридизације за *RoCPSf*, *RoKSL1f*, *RoCPSm* и *RoKSL1m* биле су 66 °C, 62 °C, 70 °C и 67 °C, редом. *PCR* производи су директно третирани рестрикционим ензимима и након тога пречишћени на гелу. Лигација у одредишне векторе обављена је уз помоћ BamHI и NotI „лепљивих" крајева. Плазмиди који су коришћени за експресију у ћелијама квасца били су: pUTDH3 за *RoCPS* и pHTDH3myc за *RoKSL1*. На овај начин конструисани су следећи вектори: pHTDH3-*RoCPSf*, pHTDH3-*RoCPSm*, pUTDH3-*RoKSLf* и pUTDH3-*RoKSLm*.

Табела 4. Секвенце прајмера коришћене за изолацију цитохром *P450* кандидата. Наведене су температуре хибридизације у *PCR* реакцијама. У називима прајмера назначено је којим рестрикционим ензимима је обављено клонирање.

Назив прајмера	Секвенца прајмера	Та (°C)	Одредишни вектор	Назив гена
SfruN01C007784/85 EcoRI For *SfruN01C007784/85 NotI Rev*	5' -GCATGAGAATTCATGGAGATCCATATTCCATCTC- 3' 5' -GCATGAGCGGCCGCTTTATTTGGTGGGCAAAGWTC-3'	65	pWTDH3	*CYP71AxSf3*
SfruN01C007784/85 NheI For *SfruN01C007784/85 HpaI Rev*	5' -GCATGAGCTAGCATGGAGATCCATATTCCATCTC-3' 5' -GCATGAGTTAACTTATTTGGTGGGCAAAGWTC-3'	63,2	pGA643	
SfruN01C007784/85 EcoRI For *SfruN01C007784/85 NotI Rev*	5' -GCATGAGAATTCATGGAGATCCATATTCCATCTC- 3' 5' -GCATGAGCGGCCGCTTTATTTGGTGGGCAAAGWTC-3'	65	pWTDH3	*CYP71AxSf4*
SfruN01C002897 BamHI For *SfruN01C002897 XhoI Rev*	5' -GCATGAGGATCCATGCACAATCTCGCTGGC- 3' 5' -GCATGACTCGAGAGGATTGACATTTATTTGGTATGC- 3'	62	pWTDH3	*CYP71AxSf1*
Sfru.N01.C002897-98 XbaI For *Sfru.N01.C002897 BamHI Rev*	5'-GCATGATCTAGAATGCACAATCTCGCTGGC-3' 5'-GCATGAGGATCCAGGATTGACATTTATTTGGTATGC-3'	61,4	pGA643	
SfruN01C005075 HindIII For *SfruN01C005075 BglII Rev*	5'-GCATGAAAGCTTATGGAAATGGATGACTTCCAC-3' 5'-GCATGAAGATCTTTAATTCTTGGAGCTAATAGTTGC-3'	63,2	pGA643	*CYP71AySf1*
Sfru.N01.C005693 HindIII For *Sfru.N01.C005693 BamHI Rev*	5'-GCATGAAAGCTTATGGAAGGCAACATCTACAGC-3' 5'-GCATGAGGATCCCTAGAGTTTGCGCAGACGC-3'	63,2	pGA643	*CYP72AxSf1*
SfruN01C007652/53 MfeI For *SfruN01C007652/53 NotI Rev*	5'-GCATGACAATTGATGGGCTTGTTAGATTACCC-3' 5'-GCATGAGCGGCCGCTTTACTTAACTCTGGATAACCTCACTC-3'	59	pWTDH3	*CYP96xSf2*
SfruN01C007652/53 HindIII *SfruN01C007652/53 BamHI*	5'-GCATGAAAGCTTATGGGCTTGTTAGATTACCC-3' 5'-GCATGAGGATCCTTACTTAACTCTGGATAACCTCACTC-3'	59	pGA643	
SfruN01C012726 HindIII For *SfruN01C012726 BamHI Rev*	5'- GCATGAAAGCTTATGGGCAACATTGAATTC -3' 5'- GCATGAGGATCCTCACTCTCTCTTAGATAACTGTACC -3'	57	pGA643	*CYP96xSf1*
SfruN01C013081 XbaI For *SfruN01C013081 BglII Rev*	5'-GCATGATCTAGAATGGATGTTTTCACTTATACAG-3' 5'-GCATGAAGATCTTTATAGTTTGGTAAGAATCAAGTGTGC-3'	58	pGA643	*CYP72xSf1*
SfruCYP76n EcoRI F *SfruCYP76n_XbaI_R*	5'-GCATGAGAATTCATGGATCCCTTCCCTCTTGTAG-3' 5'-GCATGATCTAGATCACGCCTTAATCGGAACGATCTT-3'	68	pWTDH3	*CYP76AAxSf2*
SfruCYP76n_XbaI_F *SfruCYP76n_BamHI_R*	5'-GCATGATCTAGAATGGACCCATTCCCTCTTGTAG-3' 5'-GCATGAGGATCCTCACGCCTTAATCGGAACGATCTT-3'	68	pGA643	
RoffN01C033986 BamHI For *RoffN01C033986 XhoI Rev*	5′-GCATGAGGATCCATGTCTCATCCCACACCACG-3′ 5′-GCATGACTCGAGTTATTTGATGGCCGGCAAAGGT -3′	70	pWTDH3	*CYP71AxRo1*
RoffN01C033986 XbaI For *RoffN01C033986 BamHI Rev*	5'-GCATGATCTAGAATGTCTCATCCCACACCATCG-3' 5'-GCATGAGGATCCTTATTTGATGGCCGGCAAAGGT-3'	70	pGA643	

RoffN01C034529 BamHI For	5' -GCATGAGGATCCATGGAGGAAATTCAGTTCAATCC-3'	67	pWTDH3	*CYP71AyRo1*
RoffN01C034529 XhoI Rev	5' -GCATGACTCGAGTTATTTGGAGCGAGACGCAAC -3'			
RoffN01C034529 HindIII For	5'-GCATGAAAGCTTATGGAGGAAATTCAGTTCAATCC-3'	66,9	pGA643	
RoffN01C034529 BglII Rev	5'-GCATGAAGATCTTTATTTGGAGCGAGACGCAAC-3'			
RoffN01C034470 BamHI For	5' -GCATGAGGATCCATGGAACTCGTATCATCCCAG- 3'	66	pWTDH3	*CYP72AxRo4*
RoffN01C034470 NotI Rev	5' -GCATGAGCGGCCGCTCTACAGCTTGTGCAGAAGCAAATAAG- 3'			
RoffN01C034470 HindIII For	5'-GCATGAAAGCTTATGGAACTCGTATCATCCCAG-3'	65,2	pGA643	
RoffN01C034470 BglII Rev	5'-GCATGAAGATCTCTACAGCTTGTGCAGAAGCAAATAAG-3'			
RoffN01C034550 BamHI For	5' -GCATGAGGATCCATGGAACTAGTTTACCAAATAATATC- 3'	60	pWTDH3	*CYP72AxRo2*
RoffN01C034550 XhoI Rev	5' -GCATGACTCGAGCTAGAGTTTGTGCAGAAGCAAG- 3'			
RoffN01C034550 HindIII For	5'-GCATGAAAGCTTATGGAACTAGTTTACCAAATAATATC-3'	60	pGA643	
RoffN01C034550 BglII Rev	5'-GCATGAAGATCTCTAGAGTTTGTGCAGAAGCAAG-3'			
RoffN01C034293 MfeI For	5' -GCATGACAATTGATGGGCGTGTTAGATTACCCAG-3'	68	pWTDH3	*CYP96xRo1*
RoffN01C034293 NotI Rev	5' -GCATGAGCGGCCGCTCAGCATATGTTACAGTTGAGTTGAGG -3'			
RoffN01C034293 HindIII For	5'-GCATGAAAGCTTATGGGCGTGTTAGATTACCCAG-3'	65,2	pGA643	
RoffN01C034293 ClaI Rev2	5'-GCATGAATCGATAGCATATGTTACAGTTGAGTTGAGG-3'			
RoffN01C034476 BamHI For	5' -GCATGAGGATCCATGGCCATATTTGATTTCCACTACG-3'	69	pWTDH3	*CYP96xRo2*
RoffN01C034476 XhoI Rev	5' -GCATGACTCGAGTCAGTAGTCTCTCTTAGATAACGCCACC-3'			
RoffN01C034476 XbaI For	5'-GCATGATCTAGAATGGCCATATTTGATTTCCACTACG-3'	70	pGA643	
RoffN01C034476 BamHI Rev	5'-GCATGAGGATCCTCAGTAGTCTCTCTTAGATAACGCCACC-3'			
RoffN01C027382 BamHI For	5' -GCATGAGGATCCATGTTTATGGAAATATTATACAGC-3'	55	pWTDH3	*CYP72xRo1*
RoffN01C027382 NotI Rev	5' -GCATGAGCGGCCGCTCTAATGGAGTCTGTGCATGA-3'			
RoffN01C027382 XbaI For	5'-GCATGATCTAGAATGTTTATGGAAATATTATACAGC-3'	58	pGA643	
RoffN01C027382 BglII Rev	5'-GCATGAAGATCTCTAATGGAGTCTGTGCATGA-3'			
RoffCYP76nA_BamHI_F	5'-GCATGAGGATCCATGGATTCTTTTCCTCTTCTC-3'	61	pWTDH3	*CYP76AAxRo3*
RoffCYP76nA_XhoI_R	5'-GCATGACTCGAGTTATACCTTAAACGGAACGATC-3'			
RoffCYP76nA_XbaI_F	5'-GCATGATCTAGAATGGATTCTTTTCCTCTTCTC-3'	61	pGA643	
RoffCYP76nA_BamHI_R	5'-GCATGAGGATCCTTATACCTTAAACGGAACGATC-3'			
RoffCYP76nA BamHI F	5'-GCATGAGGATCCATGGATTCTTTTCCTCTTCTC-3'	61	pWTDH3	*CYP76AAxRo4*
RoffCYP76nB_XhoI_R	5'-GCATGACTCGAGTTATGCCTTAAAGGGAACTATC-3'			
RoffCYP76nA_XbaI_F	5'-GCATGATCTAGAATGGATTCTTTTCCTCTTCTC-3'	61	pGA643	
RoffCYP76nB_BamHI_R	5'-GCATGAGGATCCTTATGCCTTAAAGGGAACTATC-3'			

Табела 5. Комбинације рестрикционих ензима коришћених за сечење секвенци за потребе клонирања.

Назив гена	Одредишни вектор	Рестрикциони ензими	
		Сечење фрагмента ДНК	Сечење одредишног вектора
SfCPS	ptacHA	BamHI x MfeI	BamHI x EcoRI
	pUTDH3	BamHI x NotI	BamHI x NotI
	pGA643	HindIII x BglII	HindIII x BglII
SfKSL	ptacHA	BamHI x XhoI	BamHI x XhoI
	pHTDH3	BamHI x XhoI	BamHI x XhoI
	pGA643	HindIII x BglII	HindIII x BglII
CYP71AxSf3	pWTDH3	EcoRI x NotI	EcoRI x NotI
	pGA643	NheI x HpaI	XbaI x HpaI
CYP71AxSf4	pWTDH3	EcoRI x NotI	EcoRI x NotI
CYP71AxSf1	pWTDH3	BamHI x XhoI	BamHI x XhoI
	pGA643	XbaI x BamHI	XbaI x BglII
CYP71AySf1	pGA643	HindIII x BglII	HindIII x BglII
CYP72AxSf1	pGA643	HindIII x BamHI	HindIII x BglII
CYP96xSf2	pWTDH3	MfeI x NotI	EcoRI x NotI
	pGA643	HindIII x BamHI	HindIII x BglII
CYP96xSf1	pGA643	HindIII x BamHI	HindIII x BglII
CYP72xSf1	pGA643	XbaI x BglII	XbaI x BglII
CYP76AAxSf2	pWTDH3	EcoRI x XbaI	EcoRI x XbaI
	pGA643	XbaI x BamHI	XbaI x BglII
CYP71AxRo1	pWTDH3	BamHI x XhoI	BamHI x XhoI
	pGA643	XbaI x BamHI	XbaI x BglII
CYP71AyRo1	pWTDH3	BamHI x XhoI	BamHI x XhoI
	pGA643	HindIII x BglII	HindIII x BglII
CYP72AxRo4	pWTDH3	BamHI x NotI	BamHI x NotI
	pGA643	HindIII x BglII	HindIII x BglII
CYP72AxRo2	pWTDH3	BamHI x XhoI	BamHI x XhoI
	pGA643	HindIII x BglII	HindIII x BglII
CYP96xRo1	pWTDH3	MfeI x NotI	EcoRI x NotI
	pGA643	HindIII x ClaI	HindIII x ClaI
CYP96xRo2	pWTDH3	BamHI xXhoI	BamHI x XhoI
	pGA643	XbaI x BamHI	XbaI x BglII
CYP72xRo1	pWTDH3	BamHI xNotI	BamHI xNotI
	pGA643	XbaI xBglII	XbaI x BglII
CYP76AAxRo3	pWTDH3	BamHI xXhoI	BamHI x XhoI
	pGA643	XbaI xBamHI	XbaI x BglII
CYP76AAxRo4	pWTDH3	BamHI xXhoI	BamHI x XhoI
	pGA643	XbaI xBamHI	XbaI x BglII

3.14.4. Функционална карактеризација гена хетерологом експресијом

За испитивање активности изолованих гена, коришћене су следећи организми:

***Escherichia coli*:**

BL21-CodonPlus (DE3)-RIL – сој бактерије *E. coli* који је конструисан на тај начин да садржи додатне копије гена који кодирају *argU*, *ileY*, и *leuW* тРНК. Недостатак ових тРНК често ограничава транслацију хетерологих протеина у *E. coli*. На додатном плазмиду (pACYC), овај бактеријски сој садржи и ген за отпорност на хлорамфеникол.

***Saccharomyces cerevisiae*:**

AM104 – сој квасца који на свом хромозому садржи вишеструке интеграције *K6R* стабилизоване верзије *HMG2*, инактивирајућу мутацију на једном од алела сквален синтазе *ERG9* и убиквитин лигаза *UBC7* и *SSM4*, и једну копију *GGDPS1* гена врсте *Cistus creticus* (Falara и сар., 2010) на 3' крају *FLO8* гена.

AM113 – сој квасца који садржи хетерозиготне делеције за гене *ERG9*, *UBC7*, *SSM4*, *MCT1* и *WHI2*, експримира ген *GGDPS1* из врсте *Cistus creticus*, *FDPS1* ген из врсте *Salvia fruticosa* и садржи две копије стабилизоване варијанте гена *HMG2*.

***Agrobacterium tumefaciens*:**

GV3101 – сој за трансформацију биљака који у геному садржи ген за отпорност на рифампицин. На *Ti* плазмиду pMP90 садржи ген за отпорност на гентамицин.

3.14.4.1. Функционална карактеризација потенцијалних терпен синтаза SfCPS и SfKSL у бактерији *E. coli*

Конструкти ptacHA-SfCPS и ptacHA-SfKSL уведени су у *BL21-CodonPlus (DE3)-RIL E. coli* компетентне ћелије трансформацијом. Течне културе трансформисаних бактерија (200 *ml*), пре индукције додавањем изопропил-*β*-D-тиогалактозидом (*IPTG*) у медијум, гајене су у Ерленмајер боци запремине 1 *l* на 37 °C до одговарајуће оптичке густине на 600 *nm* у течном Лурија-Бертани (*LB*) медијуму са додатком антибиотика за селекцију (50 *μg/ml* ампицилин, 50 *μg/ml* канамицин, 17 *μg/ml* хлорамфеникол), уз сталну аерацију на хоризонталној ротационој мешалици, при брзини од 200 обртаја у минути. После индукције, културе су гајене на собној температури. У циљу дефинисања оптималних услова за бактеријску експресију SfCPSm протеина, тестиране су комбинације различитих параметара индукције и услова раста. Индукција синтезе протеина помоћу *IPTG* у концентрацијама од 0,4 *mM* и 1,0 *mM* је тестирана, затим четири различита времена инкубирања након индукције (4 *h*, 8 *h*, 12 *h*, 18 *h*), и такође две различите вредности оптичке густине на 600 *nm* бактеријске културе (OD_{600}=0,5 и OD_{600}=1) у тренутку индукције. Бактеријска експресија SfKSLm протеина извршена је на тај начин што су културе инкубиране на собној температури у трајању од 16 *h* после индукције са 0,4 *mM IPTG*, у тренутку када је оптичка густина достигла вредност 0,5. Након тога, бактеријске културе су сталожене центрифугирањем на 12.000 *g* током 30 секунди и одложене на -20 °C до тренутка коришћења.

Пречишћавање протеина обележених *His-tagging* методом:

Сталожене ћелије су растворене у леденом лизирајућем пуферу (50 *mM* NaH_2PO_4, 300 *mM NaCl*, 10 *mM* имидазол [*pH* 8.0]) уз додатак лизозима (1 *mg/ml*) и 1 *mM* фенилметилсулфонил флуорида (*PMSF*). Количина додатог лизирајућег пуфера била је 1 *ml* на 10-20 *ml* почетне бактеријске културе. Суспензија ћелија инкубирана је на леду 30 минута, након чега су ћелије додатно лизиране соникацијом на леду. Лизат је пречишћен

центрифугирањем на 13.000 *g* током 20 минута, на 4 °C. На 1 *ml* супернатанта додато је 50 *µl* смоле за пречишћавање (*Talon metal affinity resin, Clontech*, САД) нормализоване у лизирајућем пуферу. Суспензија смоле инкубирана је на вертикалној ротационој мешалици, на 4 °C, током 60 минута како би се омогућило везивање протеина обележених полихистидинским репом за смолу. Смола је затим сталожена центрифугирањем на 1400 *rpm*, на 4 °C. Након тога, смола је испрана три пута са пуфером за испирање (50 *mM* NaH_2PO_4, 300 *mM NaCl*, 20 *mM* имидазол [*pH* 8.0]). Количина додатог пуфера износила је 1 *ml* на сваких 100 *µl* смоле. Елуирање протеина са смоле извршено је додатком 100 *µl* елуционог пуфера (50 *mM* NaH_2PO_4, 300 *mM NaCl*, 250 *mM* имидазол [*pH* 8.0]) на сваких 100 *µl* смоле. Три одвојена елуента су спојена. Први елуент је чуван у 50 % глицеролу на -80 °C до тренутка коришћења. Аликвоти фракција након испирања и преостали елуенти одмах су анализирани *SDS-PAGE* техником.

Ензимски есеји:

SfCPSm: Активност пречишћеног протеина тестирана је у пуферу који је садржавао 10 *mM MOPS*, *pH* 7.0, 20*mM* $MgCl_2$, 0,2 *mM* $MnCl_2$, 1 *mM* дитиотреитол. Као супстрат је коришћен геранилгеранил дифосфат (*GGDP*). Различите количине како супстрата *GGDP*, тако и протеина, тестиране су са циљем проналажења оптималног односа који ће резултовати највећом количином производа ензимске реакције. Такође, тестиране су различите дужине инкубирања реакција: 3 *h*, 16 *h* и 64 *h*. Ензимске реакције су након периода инкубације дефосфорилисане алкалном хидролизом, третирањем бактеријском алкалном фосфатазом у концентрацији 0,025 *U*/*µl* (*Takara*, Јапан), уз инкубирање на 37 °C. Различити периоди инкубирања са алкалном фосфатазом су тестирани- 1 *h*, 4 *h* и 16 *h*.

Две различите методе су коришћене за прикупљање испарљивих производа реакције — екстракција органским растварачем и микроекстракција у чврстој фази (*Solid Phase Microextraction — SPME*) (2

cm-50/30 *μm VB/Carboxen/PDMS StableFlex Fiber for Manual Sampling, Supelco*, САД). За екстракцију коришћењем растварача, реакционе смеше су, одмах након постављања реакција дефосфорилације, пажљиво надливене једнаком запремином етил-ацетата или хексана, и остављене да инкубирају. Након инкубације, хидролизовани производи су екстраховани у органски растварач интензивним мешањем на вортекс мешалици. Трагови воде уклоњени су додавањем мале количине Na_2SO_4, који је затим уклоњен центрифугирањем. Екстракти су чувани на 4 °C до тренутка коришћења. Концентровање екстраката на десетину запремине обављено је помоћу вакум упаривача (*Gyro Vap, Howe*, Велика Британија). За *SPME* метод, 500 *mM HCl* додат је у реакцију ензимског есеја. Након тога је уследила инкубација у трајању од 1 *h* на 50 °C уз лагану активност хоризонталне ротационе мешалице. Узорковање је обављено излагањем влакна *SPME* апаратуре у простор изнад узорка. Након 30 минута, влакно са апсорбованим једињењима поново је враћено у иглу апаратуре. Аналити су десорбовани са влакна на капиларну *GC* колону увођењем игле *SPME* апаратуре у загрејани инјектор.

SfKSLm: Активност ензима тестирана је коришћењем 3 *μl* пречишћеног рекомбинантног протеина, уз додатак пречишћеног протеина SfCPSm у истом пуферу за ензиматски есеј (10 *mM MOPS*, *pH* 7.0, 20*mM* $MgCl_2$, 0,2 *mM* $MnCl_2$, 1 *mM* дитиотреитол). Финална концентрација супстрата *GGDP* била је 200 *μM* у 50 *μl* ензимске реакције. *GGDP* је био присутан у реакцији као супстрат за SfCPSm, а производ те реакције представљао је супстрат за SfKSLm. Реакционе смеше су пажљиво надливене једнаком запремином хексана, и остављене су да инкубирају током ноћи на собној температури. Након инкубације, производи реакције су екстраховани у органски растварач интензивним мешањем на вортекс мешалици. Трагови воде уклоњени су додавањем мале количине Na_2SO_4, који је затим уклоњен центрифугирањем. Екстракти су ускладиштени на 4 °C до *GC-MS* анализе.

3.14.4.2. Функционална карактеризација гена у квасцима

3.14.4.2.1. Трансформација квасаца

Ћелије квасца инокулиране су у 5 *ml YPD* течне подлоге и инкубиране преко ноћи на 30 °C, уз аерацију на ротационој мешалици, на 200 *rpm*. Сутрадан, 5 *ml* преконоћне културе разблажено је до OD_{600}~0.1 у 50 *ml* свежег медијума и инкубирано до OD_{600}~0.5. Ћелије су преципитиране центрифугирањем на 1000 *g* током 5 минута, и затим испране са ddH_2O и растворене у 250 *µl* Раствора 1 (1 *M* литијум ацетат, 10X *TE* пуфер, ddH_2O, у односу 1:1:8, редом). 50 *µl* овако припремљене смеше ћелија додато је у микротубу од 1,5 *ml* у којој се налазило 50 *ng* плазмидне ДНК. 300 *µl* Раствора 2 (1 *M* литијум ацетат, 10X *TE* пуфер, 50 % *PEG*, у односу 1:1:8, редом) додато је у сваку микротубу, смеше су измешане на вортекс мешалици и остављене да инкубирају на 30°C током 30 минута. Ћелијама је затим додато 70 *µl DMSO* након чега су подвргнуте топлотном удару на 42 °C током 15 минута. Ћелије су затим засејане на одговарајућу *Glu/CM* (*Complete minimal*) подлогу (0.13 % (w/v) *dropout* прашак, 0.67 % (*w/v*) *YNB* (*yeast nitrogen base*) без амино киселина, 2 % (*w/v*) глукоза). За чврсту подлогу, *pH* је подешена на 5.8-6.2, и коначна концентрација агара била је 2 % (*w/v*). *Glu/CM* садржи све амино киселине неопходне за раст квасца, и користи се као подлога за селекцију. Изостављање једне или више амино киселине из *dropout* прашка омогућава селекцију само оних ћелија које су трансформисане одговарајућим плазмидима.

3.14.4.2.2. Конструисање сојева

За карактеризацију гена у квасцима, коришћена је могућност да се више гена интродукује у једну ћелију, трансформацијом са више плазмида истовремено. На овај начин могуће је реконституисати читав биосинтетски пут неког једињења, а у овом раду принцип истовремене експресије искоришћен је првобитно за испитивање истовремене експресије гена *SfCPS* и *SfKSL*. Након потврде ефикасности система детекцијом синтетисаног милтирадијена, такав систем искоришћен је да се додатно

трансформише и цитохром *P450* кандидатима за следећи ген у низу. Припремљени су сојеви наведени у табели 6, трансформацијом основних сојева *AM104* и *AM113* плазмидима који су носили гене за дитерпен синтазе и цитохроме *P450*. Ген *CcGGDPS1* интегрисан у хромозом основних сојева квасца обезбеђивао је почетни супстрат у ланцу реакција. У случају функционалне карактеризације цитохрома *P450*, сојеви су додатно трансформисани конструктима pYX143-HA-*SfCPR* или pYX143-HA-*PtCPR2* који су носили гене *SfCPR* (Макрис и сар., необјављени резултати) и *PtCPR2* (D. Ro и сар., 2002) за цитохром *P450* редуктазу грчке жалфије и тополе, редом (конструкти су добијени љубазношћу др Антониоса Макриса).

3.14.4.2.3. Експресија гена у квасцима

Квасци су након трансформације инокулирани у одговарајућу течну селективну *Glu/CM* подлогу и инкубирани на хоризонталној ротационој мешалици (250 *rpm*) до засићења подлоге (24-48 *h*) на 30 °C, у Ерленмајер боцама од 250 *ml* (*SPME* анализа) и 150 *ml* (екстракција хексаном). За *SPME* анализу инокулирано је 50 *ml* подлоге, а за екстракцију хексаном 25 *ml*. Након периода инкубације, прикупљени су производи ензимских реакција или *SPME* системом или екстракцијом хексаном. За узорковање испарљивих једињења *SPME* методом, испарљива једињења су прикупљена излагањем влакна *SPME* апаратуре у атмосферу изнад 50 *ml* културе у трајању од 30 минута. Затим је влакно враћено у иглу апаратуре, и узорак је био спреман за анализу коришћењем *GC-MS* методе. За екстракцију хексаном, 25 *ml* културе квасца обављено је три пута са 25 *ml* органског растварача. Процес екстракције је подразумевао инкубацију култура са хексаном у ултрасоничном воденом купатилу на 40 °C. Трагови воде из резултујућих 75 *ml* хексанског екстракта уклоњени су додавањем $MgSO_4$, који је затим уклоњен филтрирањем екстракта кроз филтер папир. Екстракт је након тога упарен до 100 *µl* под струјом ваздуха. Екстракција за структурну карактеризацију уз помоћ *NMR* (нуклеарна магнетна резонанца) методе изведена је додавањем хексана у 750 *ml* течне културе

квасца и енергичним мућкањем рукама. Екстракција је поновљена три пута.

Табела 6. Сојеви квасаца конструисани за анализу експресије гена кандидата.

Сој квасца	Хромозомалне интеграције	Плазмидне трансформације	CPR2
AM104	Mat a/alpha, GALp-(K6R)HMG2::HOX2, ura3, his3, trp1, PTDH3-HMG2(K6R)X2-::leu2, PTDH3-HMG2(K6R)::HO1, ERG9/erg9, uBC7/ubc7, ssm4::/SSM4, PTDH3-CcGGDPS1-FLO8 -HIS3	-	-
AM104-1		*SfCPS, SfKSL*	-
AM104-1-1		*SfCPS, SfKSL, CYP71DSf2*	*SfCPR*
AM104-1-2		*SfCPS, SfKSL, CYP71DSf3*	
AM104-1-3		*SfCPS, SfKSL, CYP71AySf1*	
AM104-1-4		*SfCPS, SfKSL, CYP72AxSf1*	
AM104-1-5		*SfCPS, SfKSL, CYP71ASf1*	
AM104-1-6		*SfCPS, SfKSL, CYP71ASf4*	
AM104-1-7		*SfCPS, SfKSL, CYP72xSf1*	
AM104-1-8		*SfCPS, SfKSL, CYP96xSf1*	
AM104-1-9		*SfCPS, SfKSL, CYP72AxSf2*	
AM104-1-10		*SfCPS, SfKSL, CYP72xRo1*	
AM104-1-11		*SfCPS, SfKSL, CYP72AxRo2*	
AM104-1-12		*SfCPS, SfKSL, празан вектор*	
AM113	Mat a/alpha, GALp-(K6R)HMG2::HOX2, ura3,his3, trp1, PTDH3-HMG2(K6R)X2-::leu2, PTDH3-HMG2(K6R)::HO1, ERG9/erg9, uBC7/ubc7, ssm4::/SSM4, mct1/MCT1, whi2/WHI2 PTDH3-CcGGDPS1-FLO8, PTDH3-SfFDPS1-FLO1	-	-
AM113-1		*SfCPS, SfKSL*	-
AM113-1-1		*SfCPS, SfKSL, CYP71DSf2*	*PtCPR2*
AM113-1-2		*SfCPS, SfKSL, CYP71DSf3*	
AM113-1-3		*SfCPS, SfKSL, CYP71AySf1*	
AM113-1-4		*SfCPS, SfKSL, CYP72AxSf1*	
AM113-1-5		*SfCPS, SfKSL, CYP71ASf1*	
AM113-1-6		*SfCPS, SfKSL, CYP71ASf4*	
AM113-1-7		*SfCPS, SfKSL, CYP72xSf1*	
AM113-1-8		*SfCPS, SfKSL, CYP96xSf1*	
AM113-1-9		*SfCPS, SfKSL, CYP72AxSf2*	
AM113-1-10		*SfCPS, SfKSL, CYP72xRo1*	
AM113-1-11		*SfCPS, SfKSL, CYP72AxRo2*	
AM113-1-12		*SfCPS, SfKSL, CYP71AxRo1*	
AM113-1-13		*SfCPS, SfKSL, CYP71AyRo1*	
AM113-1-14		*SfCPS, SfKSL, CYP72AxRo4*	
AM113-1-15		*SfCPS, SfKSL, CYP96xRo1*	
AM113-1-16		*SfCPS, SfKSL, CYP96xRo2*	
AM113-1-17		*SfCPS, SfKSL, CYP71AxSf3*	
AM113-1-18		*SfCPS, SfKSL, CYP71AxSf4*	
AM113-1-19		*SfCPS, SfKSL, CYP71AxSf1*	
AM113-1-20		*SfCPS, SfKSL, CYP96xSf2*	
AM113-1-21		*SfCPS, SfKSL, CYP76AAxSf2*	
AM113-1-22		*SfCPS, SfKSL, CYP76AAxRo3*	
AM113-1-23		*SfCPS, SfKSL, CYP76AAxRo4*	
AM113-1-24		*SfCPS, SfKSL,* празан вектор	
AM113-2		*RoCPSf, RoKSL1f*	-
AM113-3		*RoCPSf, RoKSL1m*	-
AM113-4		*RoCPSm, RoKSL1f*	-
AM113-5		*RoCPSm, RoKSL1m*	-
AM113-4-1		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP71DSf2*	*PtCPR2*
AM113-4-2		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP71DSf3*	
AM113-4-3		*RoCPSm, RoKSL1f,CYP71AySf1*	
AM113-4-4		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP96xSf2*	
AM113-4-5		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP71AxRo1*	
AM113-4-6		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP71AyRo1*	
AM113-4-7		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP96xRo1*	
AM113-4-8		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP71AxSf3*	
AM113-4-9		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP71AxSf4*	
AM113-4-10		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP71AxSf1*	
AM113-4-11		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP76AAxSf2*	
AM113-4-12		*RoCPSm, RoKSL1f,CYP76AAxRo3*	
AM113-4-13		*RoCPSm, RoKSL1f, CYP76AAxRo4*	
AM113-4-14		*RoCPSm, RoKSL1f,* празан вектор	

3.14.4.3. Есеј привремене експресије у врсти *Nicotiana benthamiana*

3.14.4.3.1. Припрема компетентних ћелија *Agrobacterium tumefaciens* и њихова трансформација

За есеј привремене експресије у *Nicotiana benthamiana* коришћене су бактерије *Agrobacterium tumefaciens* соја *GV3101*. За припрему компетентних ћелија инокулирано је 5 mL *LB* течне подлоге са додатком антибиотика за селекцију (рифампицин 50 $\mu g/ml$, гентамицин 25 $\mu g/ml$), након чега су ћелије гајене на 28 °C уз сталну аерацију на ротационој мешалици (200 *rpm*). Затим је преконоћном културом инокулирано 50 mL *LB* подлоге са истим антибиотицима, и настављено је гајење на 28 °C до достизања OD_{600} од приближно 0,5. У том тренутку је раст ћелија заустављен хлађењем на леду у тајању од 15 минута. Након тога, културе су центрифугиране на 4 °C, брзином од 3000 *rpm*, током 5 минута. Ћелије су одвојене од подлоге одливањем супернатанта, и затим су растворене у 1 *ml* стерилног 20 *mM* раствора $CaCl_2$. Тако припремљене ћелије су аликвотиране по 100 μl у микротубе од 1,5 *ml* и моментално залеђене у течном азоту, након чега су пребачене на -80 °C до даље употребе.

Компетентне ћелије су појединачно трансформисане плазмидима pGA643 који су у себи носили гене од интереса (види табелу 6). Ћелије су са -80 °C пребачене на лед, и моментално након отапања, у микротубу са ћелијама додато је 1 μg плазмида. Затим су микротубе пребачене у контејнер са течним азотом, где су инкубиране 10 минута, а након тога је уследила инкубација на 37 °C трајања 5 минута. Након додавања 1 *ml LB* течне подлоге, ћелије су инкубиране на 28 °C током 4 h. Након периода инкубације, ћелије су наталожене центрифугирањем у трајању од 30 секунди на 4000 *rpm*, супернатант је одливен, а ћелијама је додато 200 μl *LB* течне подлоге. Ћелије су растворене у подлози и засејане на *LB* чврсту подлогу са антибиотицима за селекцију (рифампицин 50 $\mu g/ml$,

гентамицин 25 *μg/ml*, тетрациклин 15 *μg/ml*), након чега су остављене на 28 °C да инкубирају до појаве колонија. Провера успешности трансформације обављена је затим *PCR* техником директно на колонијама.

3.14.4.3.2. Агроинфилтрација

Трансформисани сојеви *A. tumefaciens* инокулирани су у 50 *ml LB* течне подлоге са антибиотицима за селекцију (рифампицин 50 *μg/ml*, гентамицин 25 *μg/ml*, тетрациклин 15 *μg/ml*), након чега су гајени на 28 °C, током 48 *h*, уз аерацију на хоризонталној ротационој мешалици (250 *rpm*). Ћелије су прикупљене центрифугирањем трајања 20 минута на 4000 *g*. На исти начин, припремљен је и сој који синтетише протеин p19 који врши супресију биљног *gene silencing* одговора на инфекцију (Voinnet и сар., 2003), (добијен из лабораторије Дејвида Болкомба, *John Innes Centre Norwich*, Велика Британија), а такође и сој који синтетише ген за цитохром *P450* редуктазу врсте *A. thaliana* (*AtCPR1*, *NCBI* референтни број: *NP_194183.1*; секвенца је добијена од Др Алана Тисијеа). Након тога, ћелије су поново растворене у пуферу који је садржавао 10 *mM MES*, 10 *mM* $MgCl_2$ и 100 *μM* ацетосирингон (*Sigma*, САД) до оптичке густине (OD_{600}) од приближно 0,5 и остављене да инкубирају на собној температури на ротационој мешалици (50 *rpm*) током 2 *h*. За истовремену инфилтрацију, помешане су једнаке запремине ћелија у инфилтрационом пуферу, тако да оптичка густина сваког соја посебно буде приближно 0,5. За испитивање активности гена *SfKSL*, листови су истовремено инокулирани сојевима са генима *SfCPS*, *SfKSL* и *P19*; за феругинол синтазе гени *SfCPS*, *SfKSL*, *P19*, *AtCPR1* и *SfFS*/*RoFS1*/*RoFS2* су коришћени; за цитохроме *P450* фамилије CYP71, коришћени су гени *SfCPS*, *SfKSL, SfFS, CYP71AyR01, CYP71AySf1, CYP71AxR01, CYP71AxSf1* и *CYP71AxSf3*. Као контрола, ген чија функција је испитивана замењен је празним бинарним вектором pGA643. Листови биљака *Nicotiana benthamiana* инфилтрирани су ћелијама *A. tumefaciens* након чега су биљке гајене у комори за раст на 23 °C са светлосним периодом од 16 *h* током пет дана. После тог периода, инфилтрирани листови су прикупљени и подвргнути екстракцији хексаном. Прво, листови (1 *g*) су хомогенизовани до финог праха у авану, помоћу течног азота,

након чега су екстраховани два пута са 3 *ml* хексана. Екстракција је изведена на тај начин што су хомогенизовани листови прво измешани на вортекс мешалици са хексаном, а затим је мешавина инкубирана током 15 минута у ултрасоничном купатилу. Комбиноване хексанске фракције из три екстракције раздвојене су од биљног материјала центрифугирањем на 5000 *rpm* током једног минута, а трагови воде уклоњени су додавањем $MgSO_4$. Последњи корак пред даљу анализу представљало је упаравање екстракта до коначне запремине од 50 *µl*.

3.15. Инструменталне методе хемијске анализе

3.15.1. Гасна хроматографија-масена спектрометрија (*GC-MS*)

GC-MS анализа изведена је коришћењем *Shimadzu GC/MS-QP2010* система (*Shimadzu*, Немачка) који се састојао од гасног хроматографа модела *GC-2010* повезаног са *EI* (*electron impact*) масеним спектрометром модела *QP-2010*. Бележење података и контрола *GC/MS-QP2010* система обављена је уз помоћ *GCMS solution* софтвера (*Shimadzu*, Немачка). Хроматографско раздвајање обављено је на *HP-5-MS* капиларној колони (*Agilent*, САД) (30 *m* × 0.25 *mM* унутрашњи пречник; 0.25 *µM* дебљина филма) за анализу једињења синтетисаних у квасцима и листовима *N. benthamian*, и *ZB5* (*Phenomenex*, САД) (30 *m* × 0.25 *mM* унутрашњи пречник; 0.25 *µM* дебљина филма) колони за анализу једињења добијених *E. coli* експресијом. Носећи гас је био хелијум при брзини протока 1.03 *ml/min*. За производе ензимског есеја (*E. coli* експресија) хексански екстракт је ручно инјектован у угрејан инјектор у *splitless* моду. Температура инјектора била је подешена на 230 °C. Температура колоне линеарно је повећавана од 60 °C до 240 °C градијентом од 3 °C по минуту. Коначна температура одржана је још 5 минута ради еквилибрације. За анализу екстраката квасца и листова *N. benthamiana*, коришћен је *splitless* модалитет за инјектор, а температура је износила 230 °C. Температура колоне је прво била 60 °C током једног минута, а затим је подигнута на 240 °C темпом од 3 °C по минуту, где је задржана током 15 минута. Инјекција је обављена аутоматски уз помоћ *AOC20i-AOC20s* аутосемплера. За анализу

испарљивих једињења узоркованих *SPME* апаратуром, игла система је инјектована у угрејани инјектор гасног хроматограма. Идентификација пикова је извршена софтвером *GCMS solution* (*Shimadzu*, Немачка), поређењем масених спектара са спектрима једињења из Wiley базе података масених спектара (*Registry of Mass Spectral Data, Palisade Corporation, Newfield,* САД).

3.15.1.1. Микроекстракција у чврстој фази (*SPME*)

Процес микроекстракције у чврстој фази (*SPME*) се заснива на прерасподели аналита између екстракционог медијума (влакно) и матрикса узорка. Аналити се селективно адсорбују у активном слоју влакна након чега се у инјектору хроматографа врши десорпција. Основни део *SPME* система представља тзв. *SPME* шприц, који подсећа на хроматографски, с том разликом што садржи 1 *cm* дуго влакно смештено унутар игле шприца, које је направљено од одговарајућег полимера на носачу од стопљеног SiO_2, пречника од 110 *μm*. У овом раду коришћено је влакно од полидиметилсилоксана дебљине 7 *mM* (2 *cm*-50/30 *μm VB/Carboxen/PDMS StableFlex Fiber for Manual Sampling*, *Supelco*, САД). Поступак узорковања био је следећи: влакно је излагано атмосфери унутар ерленмајера, изнад течних култура, извлачењем из металне цевчице (игле) апарата. Након одређеног времена, влакно са апсорбованим испарљивим једињењима је поново увлачено у иглу. Десорпција је вршена увођењем игле *SPME* шприца у инјектор *GC-MS* апарата и извлачењем влакна (термална десорпција).

3.15.2. *NMR* анализа производа истовремене активности ензима SfCPS и SfKSL

За *NMR* анализу, одгајено је 3750 *ml* културе квасца, а екстракција производа реакције катализоване ензимима SfCPS и SfKSL обављена је хексаном. Хексански екстракт је упарен до сува коришћењем ротационог вакуум упаривача и у струји азота. На тај начин, добијено је 120 *mg* уљасте супстанце, која је затим поново растворена у хексану, ради анализе *GC-MS*

методом. Након што је *GC-MS* анализа потврдила синтезу једињења чију је структуру било потребно утврдити, екстракт је анализиран и методом танкослојне хроматографије (*TLC*). За *TLC* су коришћене стаклене плоче са 0,25 *mM* силика гела (*SIL G-25 UV$_{254,}$ Macherey und Nagel*, Немачка), које садрже флуоресцентни индикатор. На стартну линију је стакленом капиларом нането 1-5 *μl* испитиваног хексанског екстракта. Хроматограмске плоче су стављене је стављан усправно у затворену комору за развијање, тако да је стартна линија била 0,5 *cm* изнад површине развијача. Различите смеше хексана и етил ацетата (*v/v*) су тестиране: 100:0; 95:5; 90:10; 80:20; 70:30. Развијање хроматограма је трајало до тренутка када је фронту растварача остало 1 *cm* до врха плоче. Потом је хроматограм извађен из коморе и осушен на ваздуху. Мрље су затим визуализоване под UV светлом таласне дужине 254 *nm* и додатно, прскањем реагенсом ванилин-H_2SO_4 и печењем 2 минута на 120 °C. Хроматограми су непосредно након тога скенирани.

Следећи корак био је пречишћавање екстраката раздвајањем на колони са силика гелом 60 (велична зрна 70-230 *mesh*, *Merck*, Немачка). Фракције елуиране са колоне провераване су на присуство секундарних метаболита танкослојном хроматографијом. Следећи систем елуената је коришћен: хексан-етил ацетат 100:0 (*v/v*); хексан-етил ацетат 90:10; хексан-етил ацетат 80:20. Комплетан хексански екстракт је нанешен на колону, а након проласка кроз колону прикупљено је 120 фракција од 10 *ml* и 6 финалних фракција од 30 *ml* (фракције 1-6), које су анализиране *TLC* методом уз бојење ванилином (4 фракције по тачки). Све фракције са истим *Rf*[7] вредностима обједињене су, тако да је коначан број фракција био 4. Све ове фракције су упарене до сува и измерена је њихова маса. Затим су све фракције поново растворене у хексану како би биле анализиране *GC-MS* методом. *NMR* анализа обављена је на Хемијском факултету Аристутеловог универзитета у Солуну, од стране Др Тсолеридис Константиноса. *NMR* спектри узорака бележени су помоћу *Bruker AVANCE*

[7] *Rf* — фактор задржавања — однос дужине пређеног пута компоненте и дужине пређеног пута растварача.

300 (*Bruker*, Немачка), *^{1}H-NMR* на 300 *MHz*, *^{13}C-NMR* на 75 *MHz* у деутеризованом хлороформу. Хемијски помераји изражавани су у *ppm* (енг. *parts-per-million*) користећи тетраметилсилан као стандард.

3.15.3. LC-MS анализа фенолних дитерпена

Сакупљени су листови различитих развојних ступњева, који се налазе на све већој удаљености од вршног дела изданка жалфије. За анализу утицаја услова стреса, листови су прикупљени са биљака које су гајене под натријумским сијалицама високог притиска. Удаљеност биљака од сијалица била је 120-160 *cm*, а измерени интензитет светлости износио је 15000-10000 *lux*-а. Жлездане длаке изоловане су коришћењем методе *абразија стакленим куглицама* (*bead-beater* абразија). Биљни материјал замрзнут је у течном азоту и уситњен у авану до ситног праха. Једињења су екстрахована додавањем метанола (75 %) који је садржавао мрављу киселину (0,1 %) у односу 5:1 (*ml*:*g* свеже масе), након чега је уследио корак соникације у трајању од 15 минута. Екстракти су подвргнути центрифугирању и уз помоћ *PTFE* тефлонског филтера (0.45 *μm*) филтрирани у *HPLC* виале са стакленим уметком за мале запремине.

Фенолни дитерпени су раздвојени, идентификовани и квантификовани коришћењем *LC-PDA-LTQ-Orbitrap FTMS* система (*Thermo Scientific*, САД), који се састојао од *Accela HPLC* са *photodiode array* (240-600 *nm*) детектором (*PAD*) повезаним са *LTQ/Orbitrap hybrid mass* спектрометром, и опремљеним са ESI (енг. *electron spray ionization*) извором. Инјектована запремина износила је 5 *μl*. Хроматографско раздвајање обављено је на *Luna C18/2* (3 *μm*) колони (*Phenomenex*, САД), унутрашњег пречника 2 *mM* и дужине 150 *mM*, на 40 °C. Фенолни дитерпени су елуирани коришћењем линеарног градијента од 5 до 75 % ацетонитрила (закишељеног са 0.1 % мравље киселине) током 45 минута и са протоком подешеним на 0.19 *ml*/*min*. Фенолни дитерпени су идентификовани на основу сличности са аутентичним стандардима карнозинске киселине и карнозола.

3.16. Филогенетске и анализе аминокиселинских и нуклеотидних секвенци

Анализе и поређења нуклеотидних и аминокиселинских секвенци обављена су уз помоћ програма *Vector NTI* (*Invitrogen*, САД). Поређење аминокиселинских секвенци у филогенетској анализи додатно је обављено и помоћу *ClustalW* програма (Larkin и сар., 2007). Филогенетско стабло конструисано је *Neighbor–Joining* методом (Saitou и Nei, 1987), са 1000 бутстрап (енг. *bootstrap*) пермутација, помоћу *MEGA5* софтвера (Tamura и сар., 2011). Анализа секвенци *TargetP 1.1* методологијом (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/; Emanuelsson и сар., 2000), коришћена је за предвиђање дужине секвенце која кодира за транзитне пептиде у изолованим дитерпен синтазама.

3.17. Секвенцирање нове генерације и анализа транскриптома

Секвенцирање транскриптома жлезданих длака (*Vertis Biotechnologie AG*, Немачка) обављено је помоћу *454 GS FLX Titanium* платформе (*Roche*, САД). Повезивање у контиге обављено је уз помоћ *Newbler runAssembly* модула (*Roche*, САД). Анотација асемблираних секвенци обављена је коришћењем *blastx* алгоритма, на тај начин што су секвенце упоређене са *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) базом података за секвенце пептида. Свим секвенцама рузмарина дужим од 500 *bp* и секвенцама грчке жалфије дужим од 200 *bp* додељени су *GO* (*Gene ontology*) термини, *EC* (*Enzyme ComMission*) бројеви и функционални домени, уз помоћ *FastAnnotator* интернет сервиса за анотацију транскрипата (http://fastannotator.cgu.edu.tw/; Chen и сар., 2012). Сортирање по метаболичким путевима обављено је поређењем *EC* бројева са Кјото енциклопедијом гена и генома (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes — KEGG*) и коришћењем *Blast2GO* аналитичког софтвера (http://www.blast2go.com/b2ghome; Conesa и сар., 2005). Претрага конзервираних функционалних домена обављена је коришћењем *Pfam* базе података протеинских фамилија (Finn и сар., 2014). Анотација цитохром *P450* кандидата и њихово сврставање у кланове и фамилије,

обављено је од стране др Дејвида Нелсона (*Department of Molecular Sciences, University of Tennessee Health Sciences Center*, Мемфис, САД).

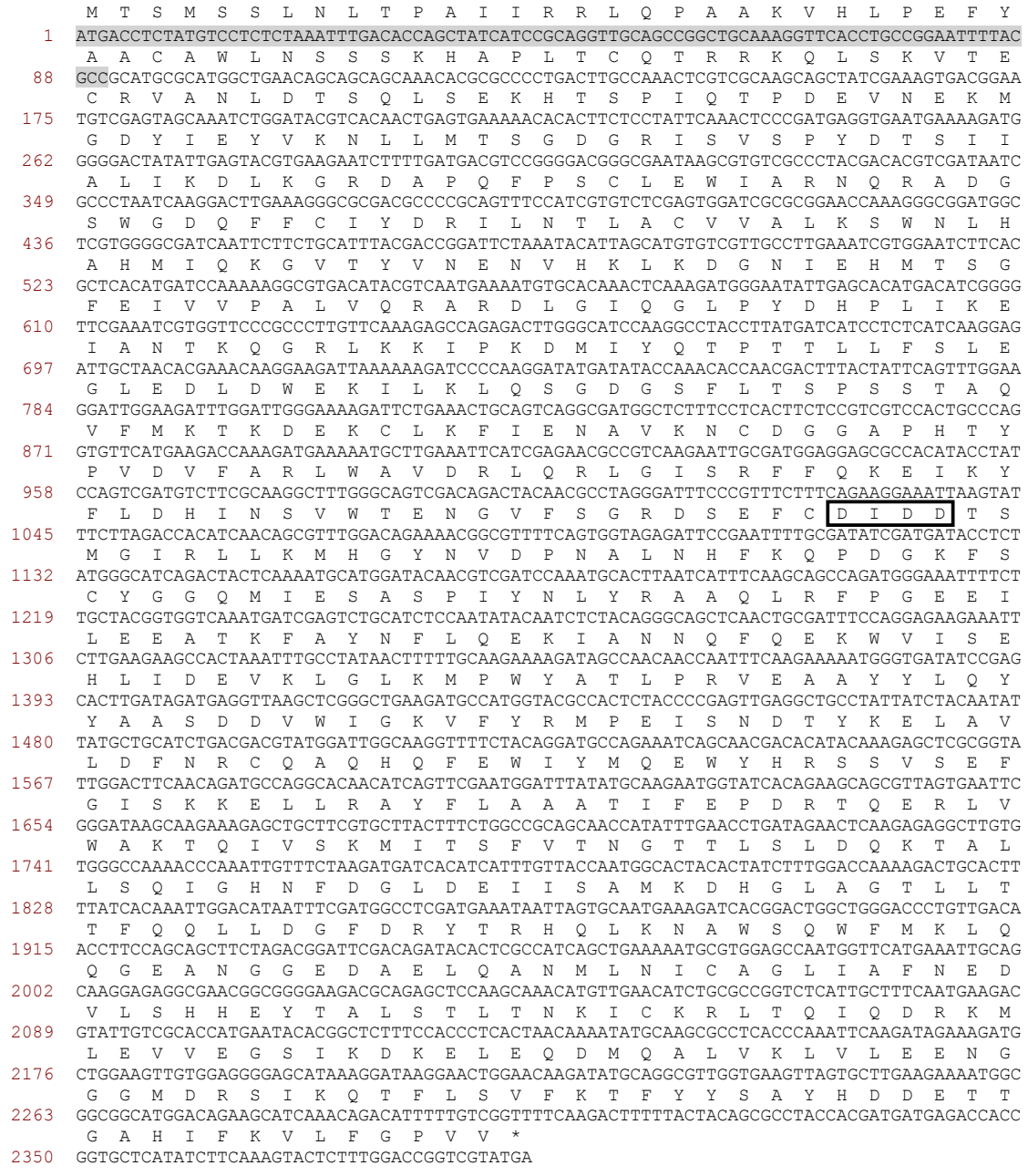
4
Резултати

4.1. Изолација и функционална карактеризација терпен синтаза грчке жалфије и рузмарина укључених у синтезу милтирадиена

4.1.1. Изолација пуне дужине цДНК гена *SfCPS* који кодира копалил дифосфат синтазу биљке *Salvia fruticosa*

Поређењем цДНК библиотеке жлезданих длака листова биљке *S. fruticosa* (Chatzopoulou и сар., 2010) са *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) базом података за секвенце пептида пронађена је делимична секвенца (контиг 195) која је показала велику хомологију са фамилијом биљних ензима из групе копалил дифосфат синтаза (CPS). Та секвенца је стога изабрана за изолацију у пуној дужини и за испитивање њене каталитичке активности. На основу поређења са хомологим секвенцама из горе поменуте базе података, утврђен је недостатак информације о 5' крају гена кандидата. Коришћењем *PCR* технике на цДНК библиотеци као матрици изолован је додатни део секвенце гена на 5' крају, али је и даље потпуна секвенца гена остала непозната. Због тога је за даље изоловање пуне дужине гена примењен другачији приступ. Припремљени су нови прајмери на основу проширене информације о секвенци гена, а као матрица је коришћена цДНК синтетисана од РНК из жлезданих длака биљке *S. fruticosa*. Техника која је коришћена јесте *5' RACE*, и уз помоћ ње је коначно идентификована непозната секвенца гена (Слика 12). Иста матрица коришћена је и за умножавање пуне цДНК гена кандидата. Изоловани ген означен је као *SfCPS* (*Salvia fruticosa copalyl diphosphate synthase*) и чини га ОРФ од 2391 базних парова који кодира протеин од 796 амино киселина (Слика 12). Филогенетске анализе потврдиле су да протеин кодиран од стране изолованог гена структурно припада групи CPS протеина. Анализа изоловане секвенце уз помоћ *TargetP 1.1* софтвера указала је на постојање потенцијалног N-терминалног транзитног пептида дугачког 30 амино киселина што је указало на локализацију зрелог протеина у пластидима. Даље, унутар секвенце SfCPS протеина детектован је и високо конзервирани DxDD мотив богат

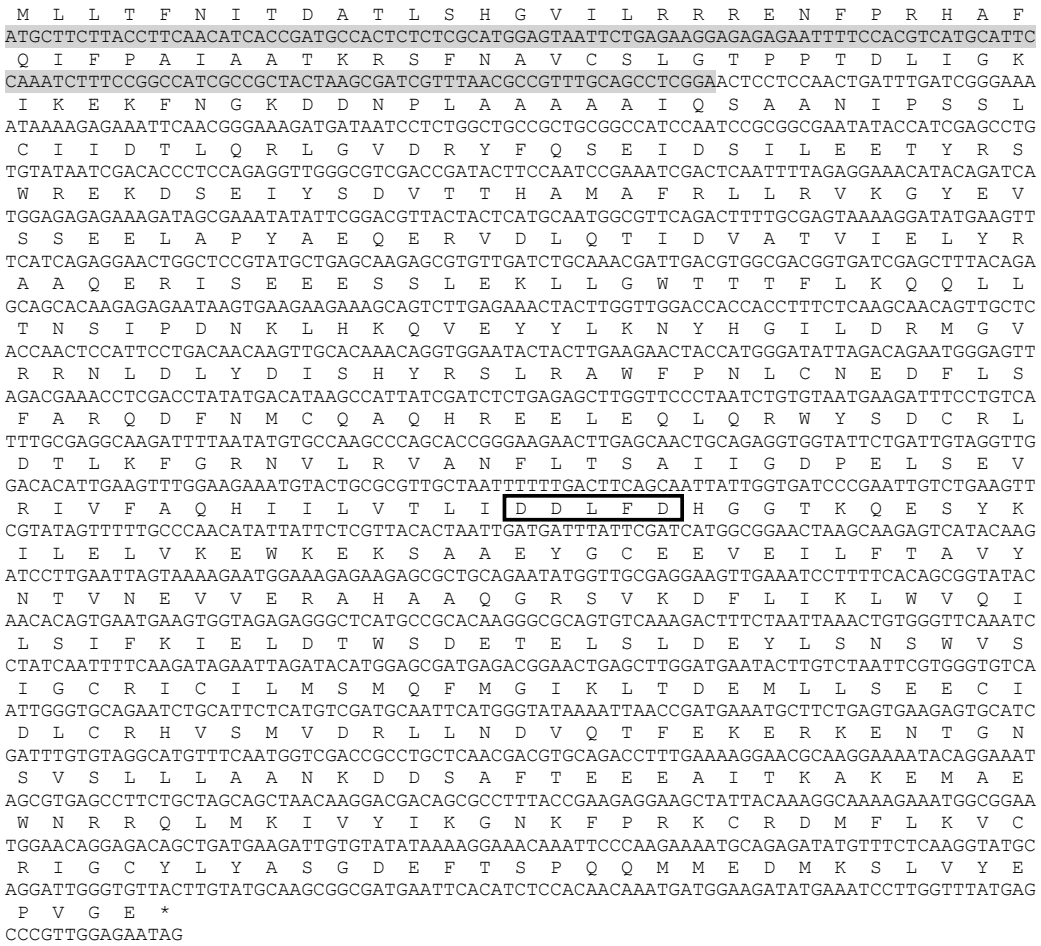
аспартатом, карактеристичан за дитерпен синтазе класе II и неопходан за циклизацију *GGDP*-а зависну од протонизације.



Слика 12. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *SfCPS* биљке *Salvia fruticosa*. Сива подлога обележава секвенцу потенцијалног N-терминалног транзитног пептида. Црни правоугаоник обележава конзервирани DxDD мотив.

4.1.2. Изолација пуне дужине цДНК гена *SfKSL* који кодира милтирадиен синтазу биљке *Salvia fruticosa*

Иста цДНК библиотека која је коришћена за идентификацију гена *SfCPS,* помогла је као основа за изоловање следећег гена у биосинтетском путу карнозичне киселине. У библиотеци је пронађа секвенца (контиг 66) коју је одликовала хомологија са фамилијом каурен синтаза (KS) из *NCBI* базе података за секвенце пептида. Контиг 66 није обухватао цели ОРФ, због чега је било неопходно изоловати недостајуће делове пуне секвенце гена. *PCR* техником на већ постојећој цДНК библиотеци умножени су делови секвенце за коју се показало да није идентична контизи 66. Поређења са хомологим секвенцама *NCBI* базе података показала су да у односу на контиг 66, нова секвенца поседује још већу сличност са фамилијом каурен синтаза, посебно са каурен синтазом филогенетски сродне биљке *Salvia miltiorrhiza*. Из тог разлога је одлучено да се као нови кандидат за KS изабере баш та новоизолована секвенца. Међутим, покушаји да се постојећа цДНК библиотека искористи за изоловање пуне дужине гена нису уродили плодом. Због тога је као матрица за амплификацију потпуне цДНК овог гена, коришћена цДНК жлезданих длака биљке *S. fruticosa,* као и у случају *SfCPS*. Изоловани ген означен је као *SfKSL* (*Salvia fruticosa kaurene synthase-like*) и чини га ОРФ од 1755 базних парова који кодира протеин од 584 амино киселина (Слика 13). Филогенетске анализе кодираног протеина потврдиле су његову структурну припадност групи KS протеина. *TargetP 1.1* софтвер је предвидео пластидну локализацију зреле форме изолованог гена (предложена дужина N-терминалног транзитног пептида била је 49 амино киселина). Као и код секвенце SfCPS, у секвенци SfKSL протеина идентификован је сличан мотив богат аспартатом, DDxxD, у овом случају карактеристичан за дитерпен синтазе класе I. Овај мотив неопходан је за везивање супстрата за протеин, за шта је неопходно и присуство Mg^{2+} јона као кофактора. Такође, SfKSL протеин не садржи у својој структури унутрашњи γ-домен, што га чини дитерпен синтазом дводоменске, $\alpha\beta$, структуре.

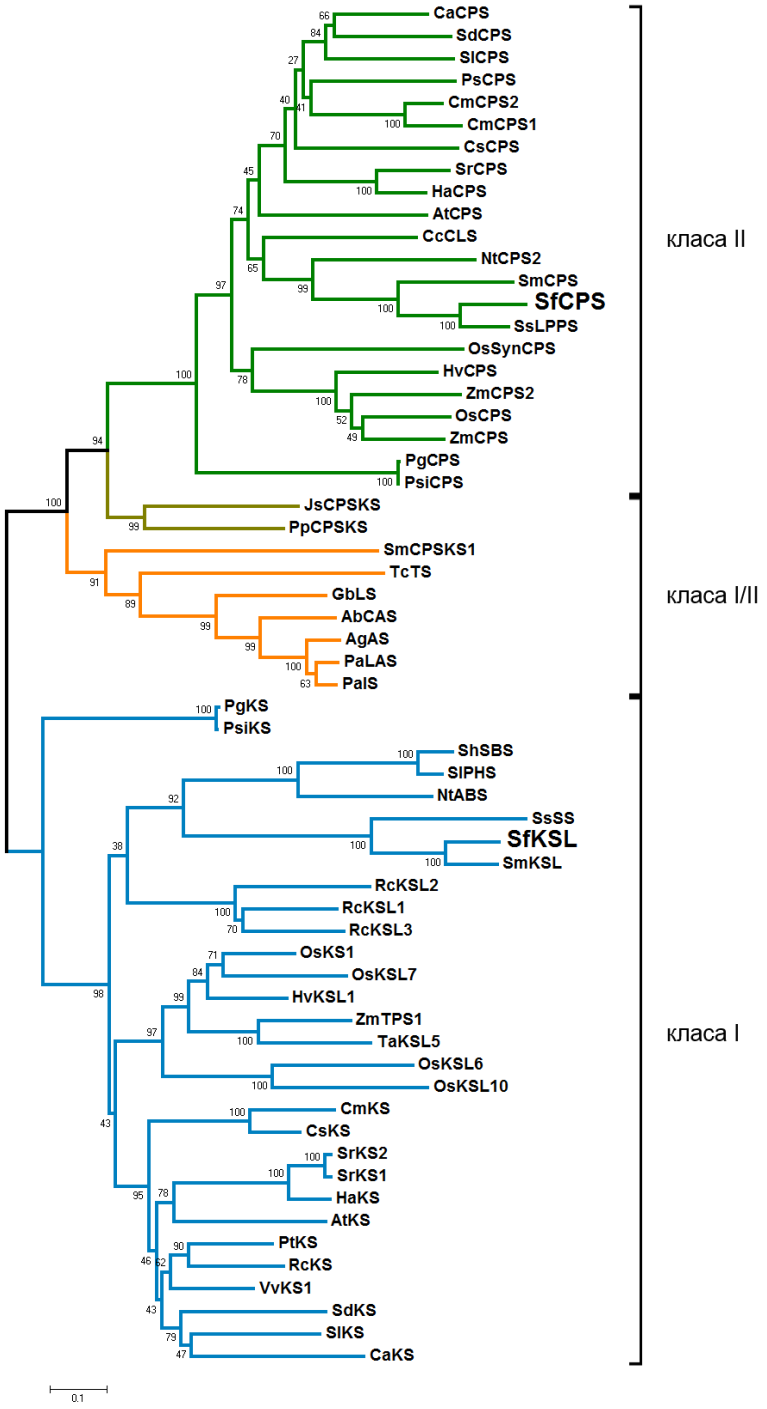


Слика 13. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *SfKSL* биљке *Salvia fruticosa*. Сива подлога обележава секвенцу потенцијалног N-терминалног транзитног пептида. Црни правоугаоник обележава конзервирани DDxxD мотив.

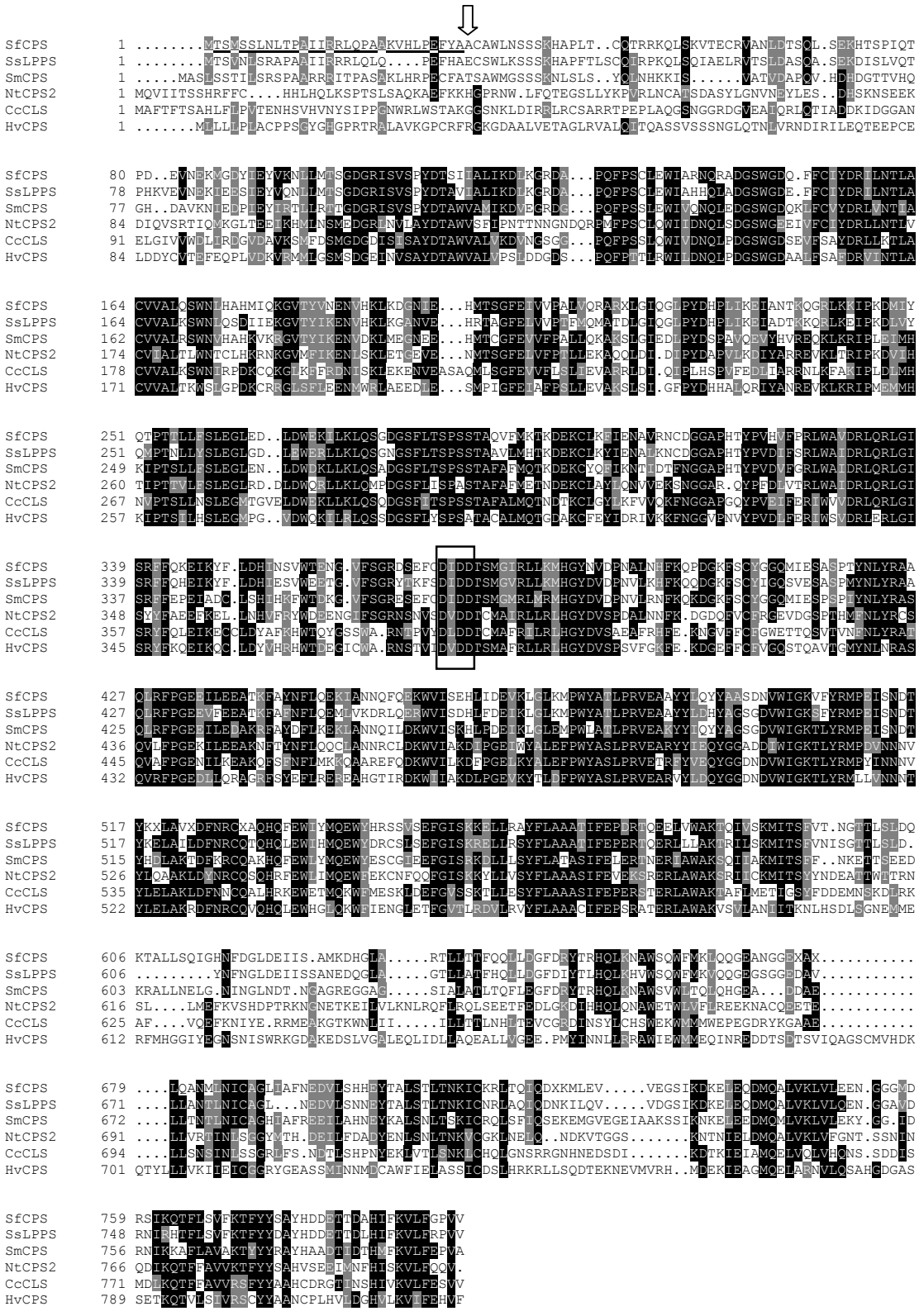
4.1.3. Филогенетска анализа гена *SfCPS* и *SfKSL*

На основу аминокиселинских секвенци које одговарају изолованим дитерпен синтазама, конструисано је филогенетско стабло (Слика 14). Најсличнији протеин SfCPS-у јесте лабда-13-ен-8-ол дифосфат синтаза (SsLPPS) врсте *Salvia sclarea* (Caniard и сар., 2012; Schalk и сар., 2012), а такође га одликује и велика сличност са копалил дисфофат синтазом из биљке *Salvia miltiorrhiza* (SmCPS) (Gao и сар., 2009). Заједно са наведеним ензимима биљака које припадају породици Lamiaceae, још два ензима, NtCPS2 дувана (Sallaud и сар., 2012) и CcCLS из врсте *Cistus creticus* (Falara

и сар., 2010), чине засебну грану одвојену од осталих ензима типа CPS. Сви наведени ензими припадају великој групи дитерпен синтаза класе II.



Слика 14. Филогенетска анализа ензима SfCPS и SfKSL која представља њихову повезаност са осталим бильним дитерпенима абиетанског типа. Филогенетско стабло је конструисано на основу neighbor-joining методе користећи *MEGA 5* софтвер (Tamura и сар., 2011). Описи скраћеница назива протеина и њихови приступни бројеви наведени су у Табели П1 Прилога.



Слика 15. Приказ поређења аминокиселински секвенци ензима SfCPS, SsLPPS, SmCPS, NtCPS2, CcCLS и HvCPS. Црним правоугаоником уоквирен је мотив DxDD богат аспартатом. Секвенца N-терминалног транзитног пептида је подвучена, а стрела указује на претпостављено место протеолизе.

Слика 16. Приказ поређења аминокиселински секвенци ензима SfKSL, SmKSL, SsSS, ShSBS, SlPHS и NtABS. Црним правоугаоником уоквирен је мотив DDxxD богат аспартатом. Секвенца N-терминалног транзитног пептида је подвучена, а стрела указује на претпостављено место протеолизе.

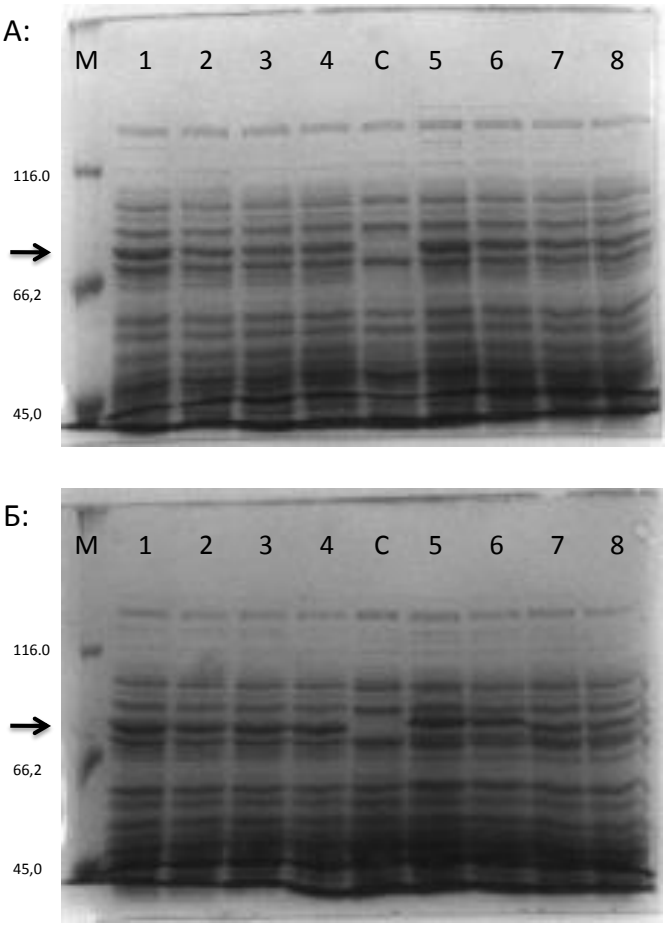
Насупрот томе, SfKSL припада дитерпен синтазама класе I. Најближи секвенца ензиму SfKSL у филогенетском стаблу јесте каурен синтаза биљке *Salvia miltiorrhiza* (SmKSL) (Gao и сар., 2009), а прва следећа јесте склареол синтаза биљке *Salvia sclarea* (SsSS) (Caniard и сар., 2012; Schalk и сар., 2012). Као и SmKSL и SsSS, и секвенца протеина SfKSL је краћа од осталих KS и KSL ензима за приближно 210 амино киселина. То одговара дужини *γ*- домена, који је код наведених ензима изгубљен током еволуције. Прикази поређења најсроднијих секвенци, са назначеним високо конзервираним мотивима, дати су у Сликама 15 и 16.

4.1.4. Функционална карактеризација гена *SfCPS* и *SfKSL*

Висока хомологија изолованих гена са познатим и окарактерисаним дитерпен синтазама сама по себи не говори довољно о крајњем производу активности ензима које кодирају. Често се дешава да филогенетско груписање аминокиселинских секвенци дитерпен синтаза не буде у складу са производима који су резултат њихове каталитичке активности. Због тога је након изолације описаних гена приступљено испитивању њихове функције, уз помоћ различитих система за експресију хетерологих гена, након чега су производи *in vitro* и *in vivo* есеја испитивани уз помоћ *GC-MS* методе. Детаљни резултати ових експеримената описани су у наставку.

4.1.5. Функционална *in vitro* карактеризација гена *SfCPS* експримираног у бактерији *Escherichia coli*

Метода која је коришћена за расветљење функције гена *SfCPS* јесте експресија у бактерији *Escherichia coli*, праћена *in vitro* карактеризацијом. У ту сврху припремљена је „скраћена“ секвенца гена из које је уклоњен регион који кодира транзитни пептид (дужине 90 нуклеотида- 30 амино киселина), на основу предвиђања *TargetP 1.1* софтвера. Индукција експресије такве „зреле“ верзије гена обављена је затим у бактерији *E. coli*.

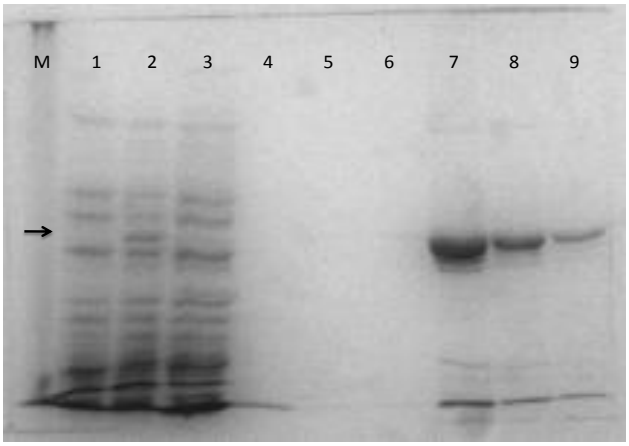


Слика 17. *SDS-PAGE* анализа резултата оптимизације услова експресије гена *SfCPS* у бактерији *Escherichia coli*. **А**, Индукција бактеријске културе на оптичкој густини 0,5. **Б**, Индукција бактеријске културе на оптичкој густини 1,0. **1-4**, концентрација *IPTG*-а 0,4 *SmM*. **5-8**, концентрација *IPTG*-а 1,0 *SmM*. Време инкубације након индукције: **1, 5**, 4h; **2, 6**, 8h; **3, 7**, 12h; **4, 8**, 18h. **C**: контрола (неиндуковани узорак). **M**, протеински маркер. Стрелица показује траку протеина SfCPS.

Ефикасна експресија хетерологног гена у бактерији *E. coli* зависи од посебних структурних карактеристика испитиваног гена и транскрибоване mRNK. Због тога је често неопходно установити оптималне услове за постизање високог приноса протеина. Такав приступ примењен је и у случају гена *SfCPS*, испитивањем различитих параметара бактеријске експресије. Тестирана је индукција синтезе протеина помоћу изопропил-*β*-*D*-тиогалактозида (*IPTG*) у две различите концентрације (0,4 *mM* и 1,0 *mM*). Даље, испитан је утицај четири различита времена инкубирања након индукције (4 *h*, 8 *h*, 12 *h*, 18 *h*), и такође две различите вредности

оптичке густине бактеријске културе (OD_{600}=0,5 и OD_{600}=1) у тренутку индукције. По анализирању резултата бактеријске експресије под различитим условима, установљено је да се највећи принос протеина добија када се култура гаји на собној температури у трајању од 4 сата, после индукције са 0,4 *mM IPTG*, у тренутку када је оптичка густина достигла вредност 0,5 (Слика 17). Ови услови су даље примењени за производњу протеина ради његовог пречишћавања и коришћења у ензимским есејима.

Пречишћавање протеина обележених уз помоћ *His-tagging* методе обављено је на начин описан у поглављу *Материјал и методе*. Афинитетно пречишћавање је било успешно и резултовало је веома чистим протеином, судећи по *SDS-PAGE* анализи (Слика 18).



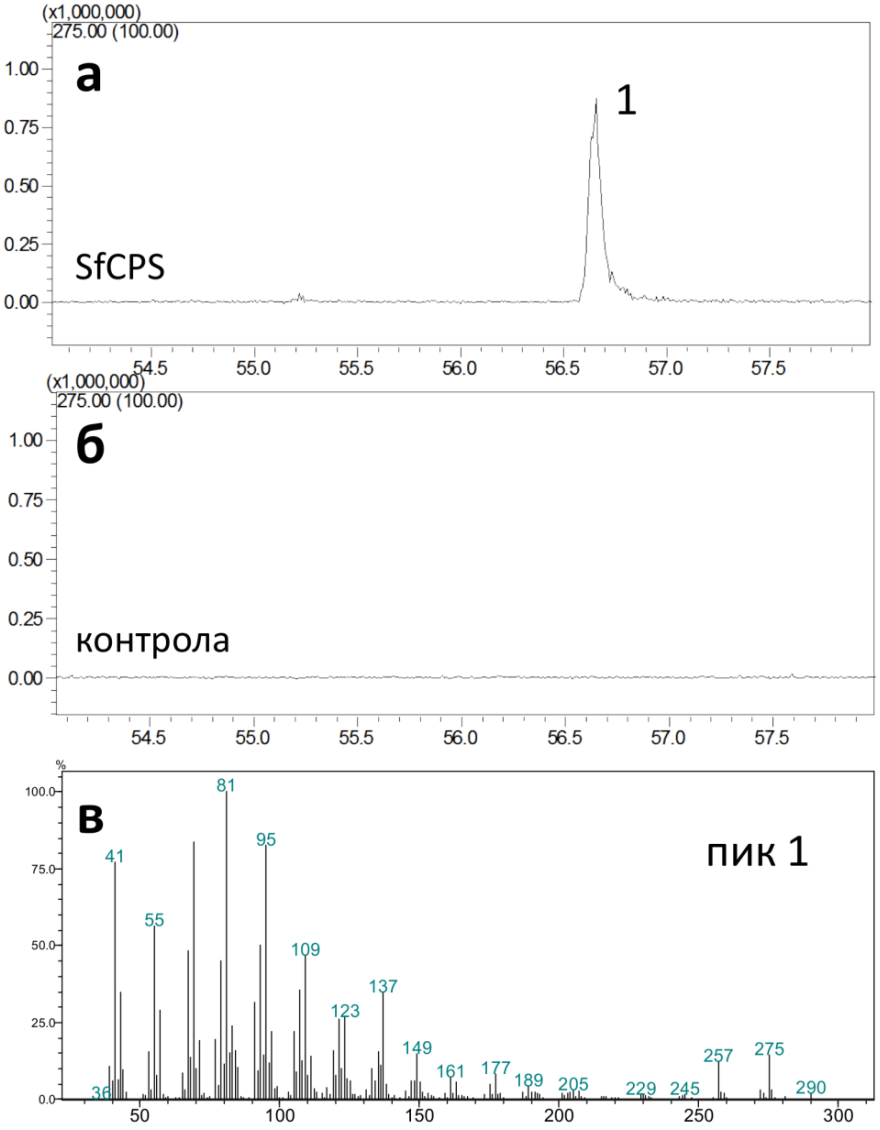
Слика 18. *SDS-PAGE* анализа резултата пречишћавања протеина SfCPS. **1**, контрола- неиндуковани узорак. **2**, индуковани узорак. **3**, невезани протеини. **4**, прво прање. **5**, друго прање. **6**, треће прање. **7**, прво испирање. **8**, друго испирање. **9**, треће испирање. **M**, протеински маркер. Стрелица показује траку протеина SfCPS.

За утврђивање оптималних услова за извођење ензимског есеја, експерименти оптимизације су такође изведени. Пик довољног интензитета на *GC-MS*-у добијен је када је као супстрат коришћен *GGDP* концентрације 60 *μM*, а реакциона смеша је инкубирана преко ноћи. Оптимална концентрација алкалне фосфатазе била је 0,025 јединица/*μl*, а

инкубирање у трајању од 4 сата на 37 °C показало се као довољно за уклањање фосфатних група са производа реакције.

SPME се није показао као корисна метода за узорковање испарљивих дитерпена, јер је уочена селективност приликом апсорпције једињења ослобођених током киселе хидролизе ензимских реакција, што није давало поуздане резултате након *GC-MS* анализе. Из тог разлога, као метода за узорковање производа реакције коришћена је екстрација органским растварачем. За постизање довољно високе концентрације производа, било је неопходно концентровати органски екстракт уз помоћ вакум упаривача пре даље анализе. Од два органска растварача који су коришћени за екстракцију испарљивих једињења, за даље експерименте изабран је хексан јер се показао као ефикаснији од етил-ацетата за екстракцију дитерпена. Хексан се такође одликује вишом стопом испаравања, што смањује време неопходно за упаравање узорка.

Органски екстракти ензимских есеја затим су испитивани помоћу *GC-MS* анализе. Кисела хидролиза узорка произвела је углавном маноол, који је познат резултат хидролизе копалил дифосфата. Међутим, излагањем узорака ензимској хидролизи помоћу алкалне фосфатазе, дефинитивно је установљена функција ензима SfCPS. Дефосфорилисани производ реакције коју катализује овај ензим идентификован је као копалол, уз помоћ поређења са *Wiley* базом података масених спектара (*Registry of Mass Spectral Data, Palisade Corporation, Newfield, NY,* САД), што је недвосмислено указивало на то да SfCPS катализује реакцију циклизације *GGDP*-а у *CDP* (Слика 19).



Слика 19. Функционална карактеризација ензима SfCPS у бактерији *E. coli*. **а**, *GC-MS* профил (275 *m/z* екстрахован хроматограм) дефосфорилисаног производа активности „зрелог“ протеина SfCPS инкубираног са *GGDP*. **б**, *GC-MS* профил контролне реакције- изостављен супстрат. **в**, Масени спектар пика 1 (копалол).

4.1.6. Функционална карактеризација гена *SfKSL*

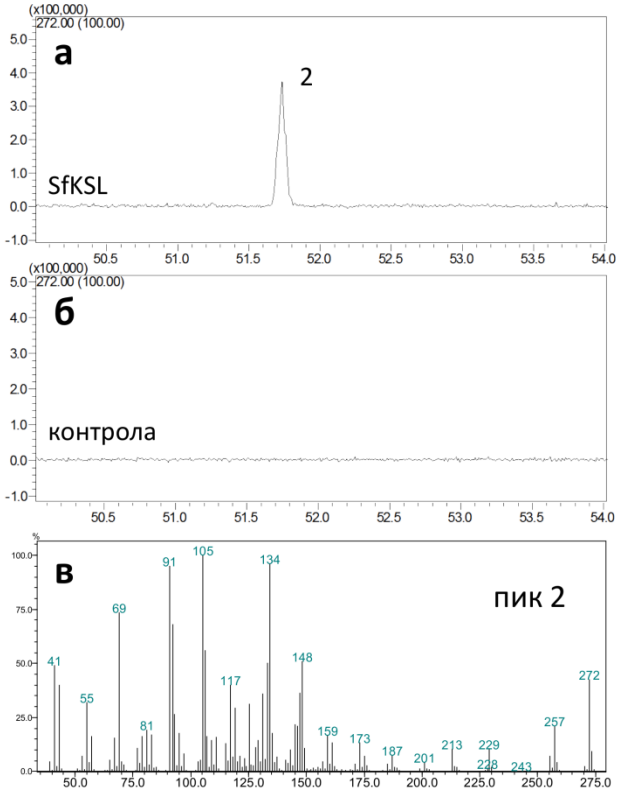
За карактеризацију следећег гена у биосинтетском ланцу ка карнозичној киселини, уз експресију у бактерији *E. coli,* коришћена су још два метода. Један од њих је био експресија у квасцима, а други привремена експресија у врсти *Nicotiana benthamiana*.

4.1.7. Функционална in vitro карактеризација гена *SfKSL* експримираног у бактерији *Escherichia coli*

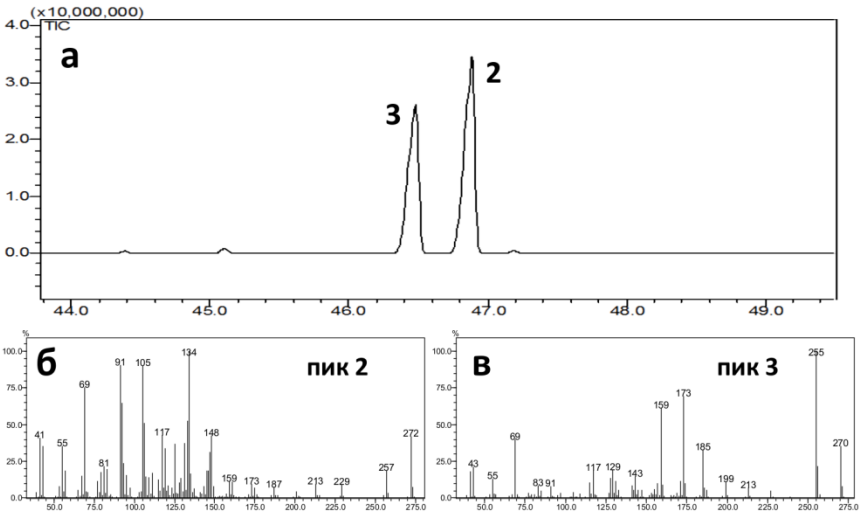
Први корак у испитивању функције изолованог гена *SfKSL* била је његова карактеризација експресијом у бактеријама комбинована са *in vitro* карактеризацијом, слично као и у случају гена *SfCPS*. Бактерије су у ову сврху синтетисале „зрелу“ верзију протеина, умањену за транзитни пептид дужине 49 амино киселина.

За бактеријску експресију коришћени су слични услови као и за *SfCPS,* са том разликом што су бактеријске културе после индукције остављене да инкубирају 16 сати на собној температури. Експримирани, хистидинима обележен протеин након тога је пречишћен.

Функционална *in vitro* карактеризација коришћењем ензимског есеја обављена је инкубацијом пречишћеног SfKSL протеина заједно са протеином SfCPS, што је обезбедило неопходан супстрат у виду CPP. Као супстрат за SfCPS, у реакцију је додат и *GGDP*. *GC-MS* анализа производа *in vitro* реакције екстрахованог хексаном резултирала је у детектовању пика који није постојао на хроматограму контролне реакције. Масени спектар овог пика највише је одговарао недавно окарактерисаној супстанци под називом милтирадиен (Gao и сар., 2009) (Слика 20).



Слика 20. Функционална карактеризација ензима SfKSL у бактерији *E. coli*. **а**, *GC-MS* профил (272 *m/z* екстрахован хроматограм) производа заједничке активности „зрелих“ протеина SfCPS и SfKSL инкубираних са *GGDP*. **б**, *GC-MS* профил контролне реакције — изостављен SfCPS. **в**, Масени спектар производа налик милтирадиену (пик 2).



Слика 21. *SPME* анализа производа истовремене активности ензима SfCPS и SfKSL у квасцима (*Saccharomyces cerevisiae*). **а**, *GC-MS* хроматограм који приказује производе реакције. **б**, Масени спектар производа налик милтирадиену (пик **2**). **в**, Масени спектар абиетатриена (пик **3**).

4.1.8. Функционална карактеризација гена *SfKSL* у квасцима (*Saccharomyces cerevisiae*)

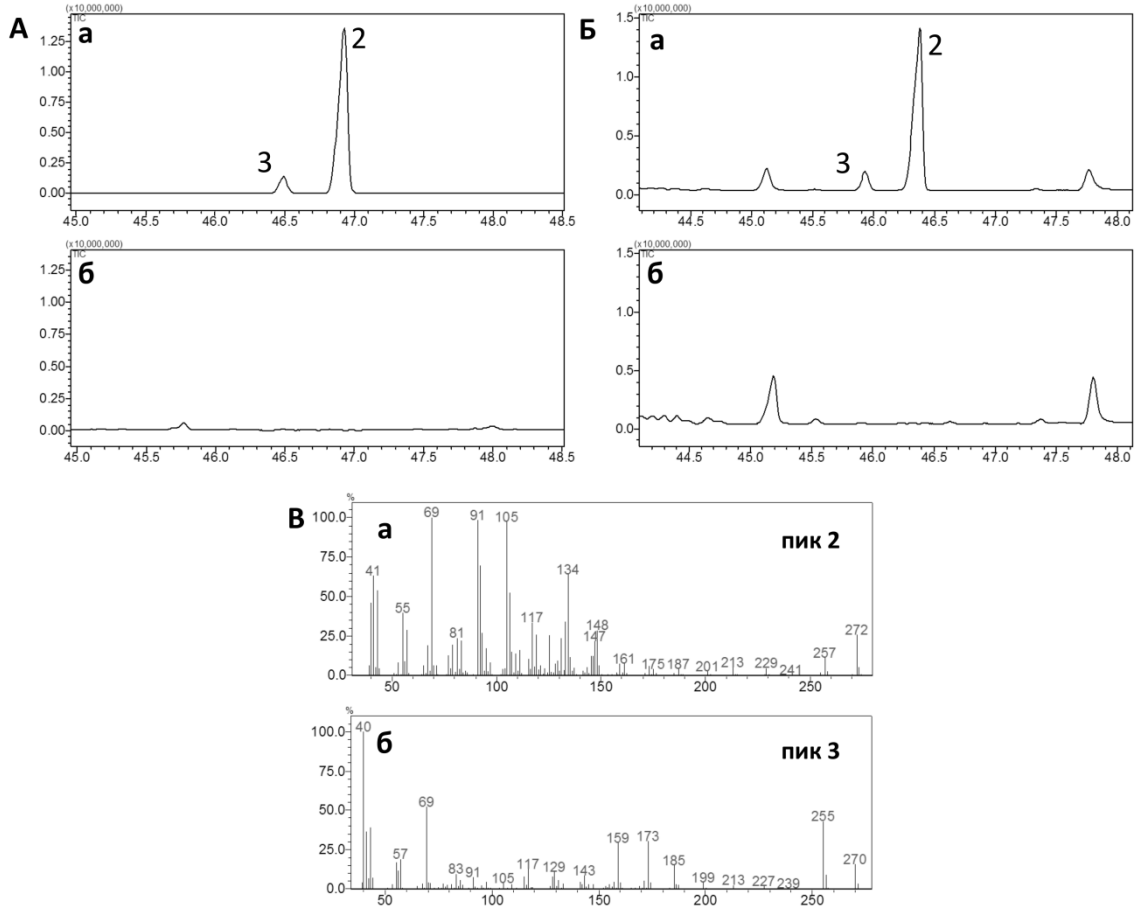
Есеји експресије у квасцима обављени су коришћењем соја *S. cerevisiae* под називом *AM104*, који је поседовао *GGDPS* ген из биљке *Cistus creticus* интегрисан у хромозом квасца. Овај сој након трансформације истовремено са обе дитерпен синтазе назван је *AM104-1*, и гајен је у виду течне културе како би дошло до синтезе производа ензимских реакција. Након периода инкубације, испарљива једињења су узоркована из атмосфере изнад културе коришћењем *SPME* система. *GC-MS* анализа прикупљених једињења указала је на постојање идентичног производа реакције као и у случају бактеријског есеја (слика 21). Као нови пик, поред потенцијалног пика за милтирадиен, уочен је и пик који по масеном спектру највише одговара абиетатриену.

4.1.9. Функционална карактеризација гена *SfKSL* есејом привремене експресије у врсти *Nicotiana benthamiana*

За *in planta* есеј привремене експресије, листови биљке *N. benthamiana* истовремено су инокулисани бактеријама *Agrobacterium tumefaciens* које су носиле бинарне векторе са пуним дужинама гена *SfCPS* и *SfKSL*. Заједно са генима чија функција се испитивала, листови су инокулисани и конструктом који је носио ген за протеин p19, како би се искористила његова улога у супресији биљног „gene silencing“ одговора. Након пет дана, уследила је екстракција инокулисаних листова хексаном и *GC-MS* анализа. Резултат ове анализе био је сличан резултату добијеном приликом испитивања експересије уз помоћ бактерија и квасаца, а то је детекција пика чији је масени спектар најсличнији спектру милтирадиена (Слика 22Б, пик 1 и 22В, а). Као и у случају експресије гена *SfKSL* у квасцима, детектован је и пик који одговара абиетатриену (Слика 22Б, пик 2 и 22В, б).

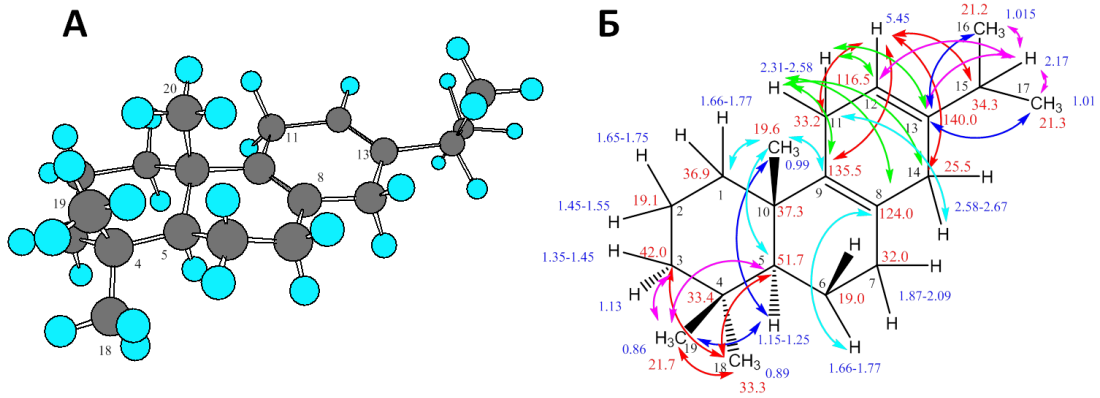
4.1.10. Карактеризација производа ензимске активности протеина SfKSL помоћу *NMR* спектроскопије

Структурна карактеризација једињења произведеног комбинованом активношћу „зреле“ верзије протеина SfCPS и SfKSL постигнута је уз помоћ *NMR* анализе.



Слика 22. Анализа хексанских екстраката квасаца и инокулисаних листова врсте *Nicotiana benthamiana*. Производња супстанце налик милтирадиену. **А**, Есеји експресије у квасцима. **а**, *GC-MS* профил хексанске фракције пречишћене на силика гел колони. Фракција садржи производе културе квасца трансформисане генима *SfCPS* и *SfKSL* (пик 1 и 2). **б**, *GC-MS* профил нетрансформисаног соја АМ104. **Б**, Есеји експресије у врсти *N. benthamiana*. **а**, *GC-MS* профил листова врсте *N. benthamiana* инокулисаних генима *SfCPS* и *SfKSL* (пик 1 и 2). **б**, *GC-MS* профил листова *N. benthamiana* инокулисаних празним pGA643 вектором. **В**, Масени спектри синтетисаних једињења. **а**, пик **2** (милтирадиен). **б**, пик **3** (абиетатриен).

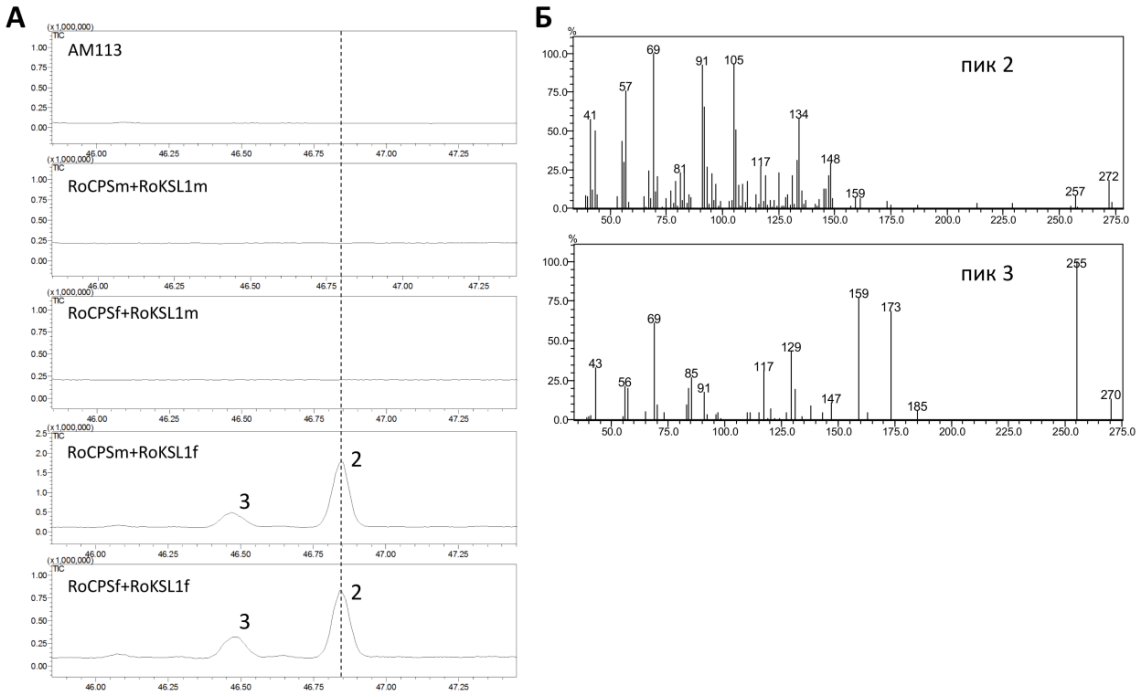
У ту сврху, повећана је запремина претходно описаног експресионог система у квасцима са циљем производње довољне количине једињења за *NMR* анализе. 3,75 литара течне културе квасца екстраховано је хексаном, након чега је уследило пречишћавање екстракта на силика гел колони. *GC-MS* анализом лоциран је производ од интереса у фракцији 1, елуираној чистим хексаном (Слика 22А). Овај поступак пречишћавања као резултат је имао добијање 20 мг фракције, што се показало као довољно за анализу уз помоћ *NMR* спектроскопије, која је обављена на Хемијском факултету Аристутеловог универзитета у Солуну, од стране др Константиноса Тсолеридиса. На темељу *1D* и *2D NMR* спектроскопије (^{1}H, ^{13}C, *DEPT*, *COSY H-H*, *HMQC* и *HMBC*) установљено је да пречишћено једињење које настаје као производ активности протеина SfKSL, по својој структури одговара милтирадиену (слика 23).



Слика 23. Структура милтирадиена. А. *3D* модел (штапићи и лоптице) израчунат по *AM1* (Austin Model 1) методу. Сивом лоптице представљају атоме угљеника, а плаве лоптице представљају атоме водоника. Б. Структура милтирадиена са означеним хемијским помацима за протоне (плаво) и угљенике (црвено). Стрелице означавају геминална ($^{2}J_{CH}$) и вицинална ($^{3}J_{CH}$) спрезања између угљеника и протона у хетеронуклеарном *HMBC* (*Heteronuclear Multi Bond Correlation*) спектру. У случају циклохексадиенског прстена могу се уочити и спрезања на даљину — $^{4}J_{CH}$. Истом бојом стрелица су приказане корелације одређеног протона са суседним угљеницима. Разлика између 18- и 19-метил група утврђена је на основу спрезања између 5-*H* и 19-CH_3 које се налазе у анти позицијама и скоро су копланарни.

4.1.11. Функционална карактеризација дитерпен синтаза рузмарина

Функција две дитерпен синтазе рузмарина, копалил дифосфат синтазе (RoCPS) и потенцијалне каурен синтазе (RoKSL1), испитана је експресијом у квасцима. Оба гена добијена су од Др Алана Тисијеа (Институт за биохемију биљака, Лајбниц, Немачка). Коришћен је *AM113* сој квасца, а испитана је функција како пуне дужине протеина (RoCPSf и RoKSL1f), тако и њихове „зреле“ верзије (RoCPSm и RoKSL1m). Следеће комбинације гена су тесиране: *RoCPSf* x *RoKSL1f*, *RoCPSf* x *RoKSL1m*, *RoCPSm* x *RoKSL1f* и *RoCPSm* x *RoKSL1m*, а одговарајући сојеви названи су *AM113-2*, *AM113-3*, *AM113-4* и *AM113-5*, редом. Течне културе квасца екстраховане су хексаном, а затим су екстракти анализирани помоћу *GC-MS* методе (Слика 24).



Слика 24. Хетеролога експресија гена *RoCPS* и *RoKSL1* у сој квасца *AM113*. **А**, Хроматограми укупних јона који приказује производе излучене у течну културу квасаца који ко-експримирају RoCPSm+RoKSL1m, RoCPSf+RoKSL1m, RoCPSm+RoKSL1f и RoCPSf+RoKSL1f. Сој квасца *AM113* коришћен је као нетрансформисана контрола. *f* – протеин пуне дужине, *m* – „зрели“ протеин; **Б**, Масени спектар милтирадиена (пик **2**) и абиетатриена (пик **3**).

Милтирадиен и абиетатриен су детектовани у културама сојева *AM113-2* и *AM113-4*, које су синтетисале следеће комбинације протеина: RoCPSf x RoKSL1f и RoCPSm x RoKSL1f.

4.2. Анализа транскриптома жлезданих длака грчке жалфије и рузмарина уз помоћ 454 секвенционирања

4.2.1. Одабир биљног материјала

Од кључне важности за успешну примену анализе транскриптома у идентификацији гена укључених у биосинтезу карнозинске киселине било је коришћење одговарајућег ткива, које се одликује високом концентрацијом овог једињења, а самим тим и високом стопом његове синтезе. У ту сврху, извршена је анализа садржаја фенолних једињења различитих ткива (жлездане длаке, листови без длака), различитих развојних стадијума листова и различитих генотипова грчке жалфије и рузмарина. Сви узорци су послати на анализу у *Plant Research International* (Универзитет и истраживачки центар, Вагенинген, Холандија), која је обављена од стране др Рика де Воса (*Ric de Vos*). Коришћена је *LC-PDA-LTQ-Orbitrap FTMS* метода оптимизована за фенолне дитерпене.

Први корак у испитивању локализације карнозинске киселине и производа њене оксидације, карнозола, у листовима грчке жалфије, представљала је анализа разлике у хемијском садржају између изолованих жлезданих длака, листова са којих су жлездане длаке уклоњене, и целих, нетакнутих, листова. За анализу су припремљени узорци младих и зрелих листова три различита генотипа: *S. fruticosa* пореклом са локалитета Врисес (Крит, Грчка), *S. fruticosa* пореклом са локалитета Кавуси (Крит, Грчка) и *S. fruticosa* дибијена из комерцијалног семена (*B & T World Seeds*), а као техника за изолацију жлезданих длака коришћена је абразија сувим ледом. Хемијском анализом овако припремљених узорака, установљене су јасне разлике у концентрацији испитиваних једињења. У жлезданим длакама младих листова генотипа „Кавуси“ детектована је највећа концентрација како карнозола, тако и карнозинске киселине.

У следећем кораку анализирана је хемијски састав листова на различитој удаљености од вршног дела изданка жалфије. Такође је испитан и утицај благе суше и светлосног стреса на садржај карнозола и карнозичне киселине. Резултати су показали да је количина карнозичне киселине значајно виша код биљака претходно изложеним стресу. Установљено је такође и благо опадање нивоа фенолних дитерпена са старењем листова како код биљака изложеним стресу, тако и код биљака гајених у нормалним условима.

Да би се прецизније утврдило место акумулације фенолних дитерпена у листовима грчке жалфије, следило је испитивање хемијског садржаја жлезданих длака и листова без жлезданих длака три различита узрасна ступња грчке жалфије. За припрему узорака жлезданих длака испробана је нова техника изолације жлезданих длака са површине листова (површинска абразија *bead-beater* апаратом). Показало се да ова техника ефикасно уклања жлездане длаке са површине листова грчке жалфије, па су на овај начин добијени узорци послати на даљу фитохемијску анализу. Анализа је указала на висок садржај карнозинске киселине у жлезданим длакама, док је карнозол преовладавао у листовима са којих су жлездане длаке биле уклоњене.

Хемијска анализа рузмарина отпочела је експериментом чији је циљ било утврђивање популације која се одликује највишим садржајем фенолних дитерпена. Две популације су испитиване: биљке *R. officinalis* одгајене из комерцијалних семена (*B & T World Seeds*, *Aigues-Vives*, Француска) и *R. officinalis* пореклом са локалитета Солун (Грчка). Да би се установило постоји ли разлика у хемијском садржају између листова различите старости, за сваку популацију одвојено су анализирани млади и старији листови. Анализа је издвојила популацију комерцијалног рузмарина (*B & T World Seeds*), као значајно богатију једињењима карнозол и карнозична киселина. Такође, није утврђена значајна разлика у садржају испитиваних једињења између два анализирана узрасна стадијума листа.

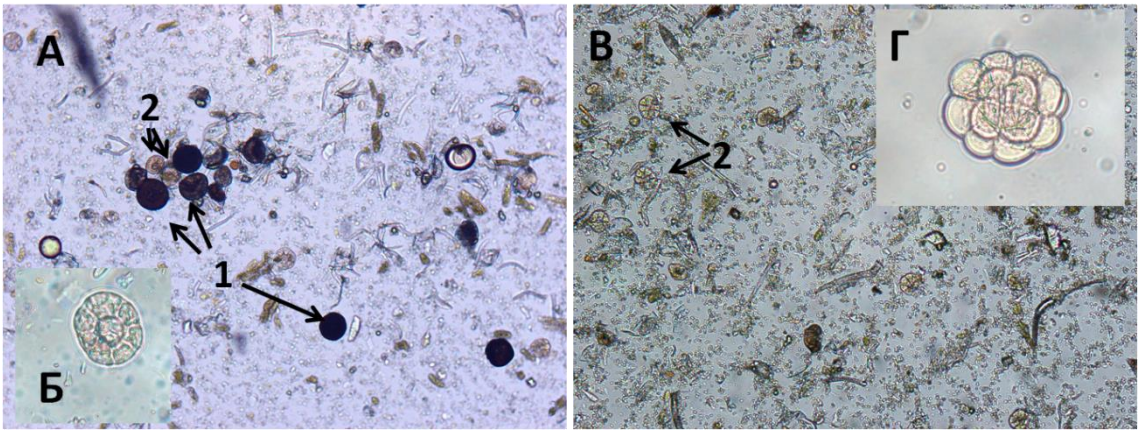
Даље, анализирана је разлика у хемијском садржају између листова позиционираних на различитим удаљеностима од вршног дела изданка жалфије, код комерцијалног (*B & T World Seeds*) генотипа. Резултати су показали веома благо опадање нивоа фенолних детерпена са старењем листова.

Хемијска анализа жлезданих длака (изолованих површинском абразијом *bead-beater* апаратом) и „голих" листова три узастопна узрасна стадијума указала је на различиту локализацију фенолних једињења, слично као у случају грчке жалфије. Жлездане длаке одликовале су се високим садржајем карнозичне киселине, док је ниво карнозола био многоструко нижи. Садржај карнозола био је низак и у односу на исти у листовима без жлезданих длака.

4.2.2. Изолација жлезданих длака и укупне РНК

На основу резултата фитохемијске анализе *LC-PDA-LTQ-Orbitrap FTMS* методом, као биљни материјал за анализу транскриптома, изабране су жлездане длаке младих листова благо стресираних биљака генотипа "Кавуси" грчке жалфије. За анализу транскриптома рузмарина, изабране су жлездане длаке млађих стадијума развића листова комерцијалног генотипа (*B & T World Seeds*). За добијање РНК довољно доброг квалитета за потребе секвенцирања читавог транскриптома, било је неопходно да се пронађе оптимална метода како за изолацију жлезданих длака са површине листова, тако и за изолацију саме РНК из тако добијеног материјала. Од техника за изолацију жлезданих длака тестирана је површинска абразија *bead-beater* апаратом и абразија сувим ледом. Такође, два различита комерцијална сета за изолацију РНК су испитана (*Spectrum Plant Total RNA Kit* (Sigma, САД) и *PureLink RNA Mini Kit* (*Ambion*, САД)). РНК добијена из жлезданих длака изолованих површинском абразијом *bead-beater* апаратом, показивала је знаке благе деградације. Насупрот томе, изолација жлезданих длака уз помоћ сувог леда показала се веома успешном. Длаке су на овај начин биле ефикасно, без озлеђивања, уклоњене са површине листова, што је утврђено

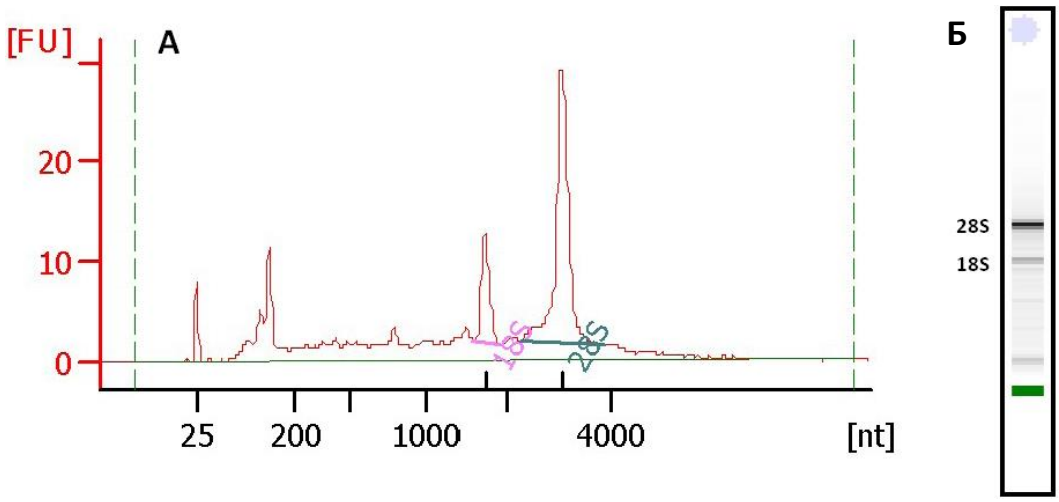
испитивањем уз помоћ оптичког микроскопа (слика 25). Такође, контаминација узорака жлезданих длака другим ћелијама листа била је минимална.



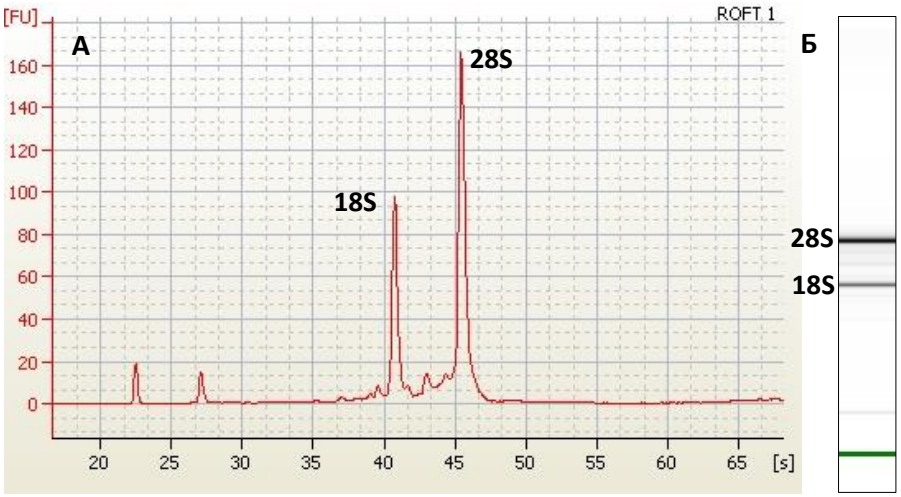
Слика 25. Микроскопске фотографије жлезданих длака изолованих са површине листова рузмарина (**А**, **Б**) и грчке жалфије (**В**, **Г**). **Б** и **Г**. Појединачне жлездане длаке. **1**. Жлездане ћелије прекривене кутикулом. **2**. „огољене" жлездане ћелије.

Процена квалитета изоловане РНК из *S. fruticosa* урађена је у компанији *Plataforma de Transcriptòmica* (*Parc Cientific de Barcelona u Universitat de Barcelona*, Шпанија), док су компанији *Bioprobe Lp R&D Laboratories* (Солун, Грчка) послати узорци *R. officinalis*. Анализа је обављена помоћу *Agilent 2100 Bioanalyzer* система (*Agilent Technologies,* САД). Софтвер *2100 Expert* процењује квалитет РНК уз помоћ *RIN* (*RNA Integrity Number*) вредности и срачунава 28S/18S однос рибозомалне РНК за сваки узорак укупне РНК. *RIN* вредност је важан показатељ квалитета РНК. Овим анализама установљено је да су различите методе изолације РНК (комплети *Spectrum Plant Total RNA* и *PureLink RNA Mini*), биле другачије ефикасности код две различите биљне врсте. За грчку жалфију, изолација уз помоћ *Spectrum Plant Total RNA* комплета резултирала је добијањем РНК чија је *RIN* вредност износила 8,1 (Слика 26), док је за рузмарин, тек коришћење комплета *PureLink RNA Mini* произвело задовољавајуће резултате. РНК добијена на тај начин била је веома високог квалитета (*RIN*=9,7, Слика 27). Будући да је квалитет изоловане РНК жлезданих длака како грчке жалфије, тако и рузмарина, задовољавао

прописане услове (*RIN* вредност у опсегу од 7 до 10), изолована РНК послата је затим на секвенцирање транскриптома у компанији *Vertis Biotechnologie AG* (Немачка).



Слика 26. Анализа квалитета укупне РНК жлезданих длака биљке *S. fruticosa* добијене помоћу система *Agilent 2100 Bioanalyzer*. **А**, Електроферограм РНК узорка. Обележени су пикови који одговарају 18S и 28S рибозомској РНК. X оса означава дужину РНК фрагмената у нуклеотидима, а Y оса јединице флуоресценције. **Б**, Синтетичка слика гела која приказује траке 18S и 28S рибозомске РНК. *Plataforma de Transcriptòmica* (Parc Cientific de Barcelona и Universitat de Barcelona, Шпанија).



Слика 27 Анализа квалитета укупне РНК жлезданих длака биљке *R. officinalis* добијене помоћу система *Agilent 2100 Bioanalyzer*. **А**, Електроферограм РНК узорка. Обележени су пикови који одговарају 18S и 28S рибозомској РНК. X оса означава време у секундама, а Y оса јединице флуоресценције. **Б**, Синтетичка слика гела која приказује траке 18S и 28S рибозомске РНК. *Bioprobe Lp R&D Laboratories* (Солун, Грчка).

4.2.3. Секвенцирање, повезивање фрагмената и идентификација гена потенцијално укључених у синтезу карнозичне киселине

Секвенцирање транскриптома жлезданих длака обављено помоћу *454 GS FLX Titanium* платформе, док је повезивање прочитаних секвенци у контиге обављено уз помоћ *Newbler runAssembly* модула (*Roche*, САД), што је резултирало добијањем 29912 асемблираних секвенци за грчку жалфију и 57254 асемблираних секвенци за рузмарин. Просечна дужина секвенци у случају грчке жалфије износила је 1099 *bp*, док је код рузмарина износила 1377 *bp*. Детаљи збирне статистике асемблирања секвенци грчке жалфије и рузмарина наведени су у табели 7.

Табела 7. Збирна статистика асемблирања секвенци врста *S. fruticosa* и *R. officinalis* добијених помоћу *454 GS FLX Titanium* платформе.

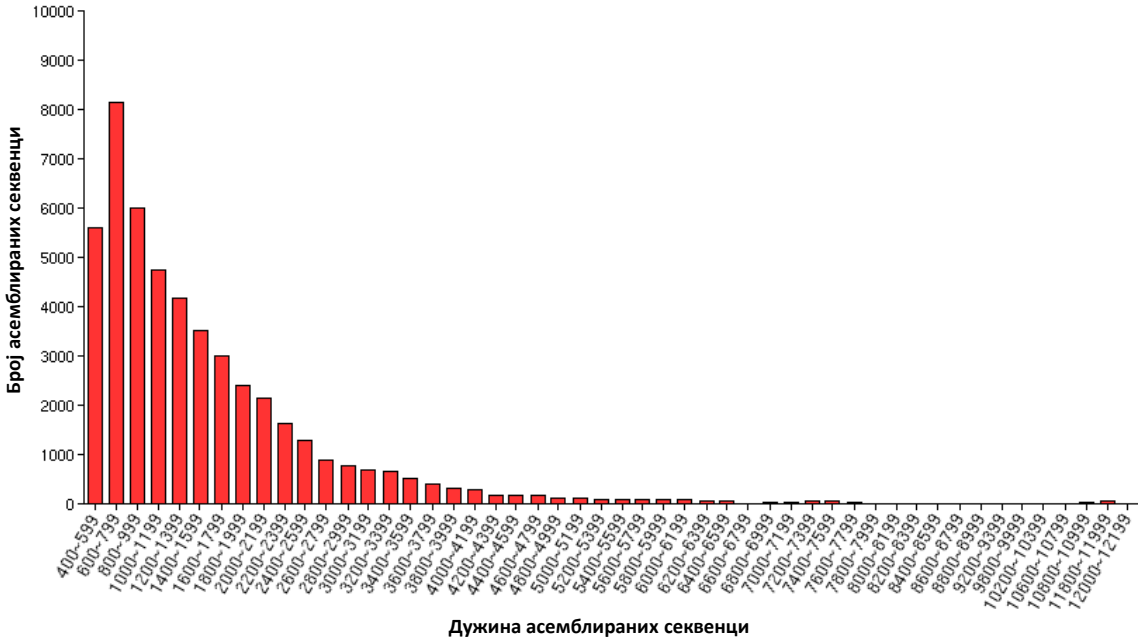
Врста	***Salvia fruticosa***	***Rosmarinus officinalis***
Број асемблираних секвенци	29912	57254
Укупна дужина секвенци	27782418	78835481
Просечна дужина секвенци	1099	1377
Максимална дужина секвенци	10338	12058
N50 дужина секвенци	1230	1831

4.2.3.1. Функционална анализа асемблираних секвенци

Уз помоћ *FastAnnotator* интернет сервиса за анотацију транскрипата обављена је функционална анализа свих секвенци рузмарина дужих од 500 *bp* и грчке жалфије дужих од 200 *bp*. Транскрипти су анотирани додељавањем *GO* (*Gene ontology*) термина, *EC* (*Enzyme Commission*) бројева и проналажењем функционалних домена.

4.2.3.2. Функционална анализа асемблираних секвенци грчке жалфије

Укупно је *FastAnnotator* интернет сервисом анализирано 29835 асемблираних секвенци. Дистрибуција секвенци по просечним дужинама приказана је на слици 28.



Слика 28. Дистрибуција просечних дужина асемблираних секвенци врсте *S. fruticosa* добијених помоћу *454 GS FLX Titanium* платформе.

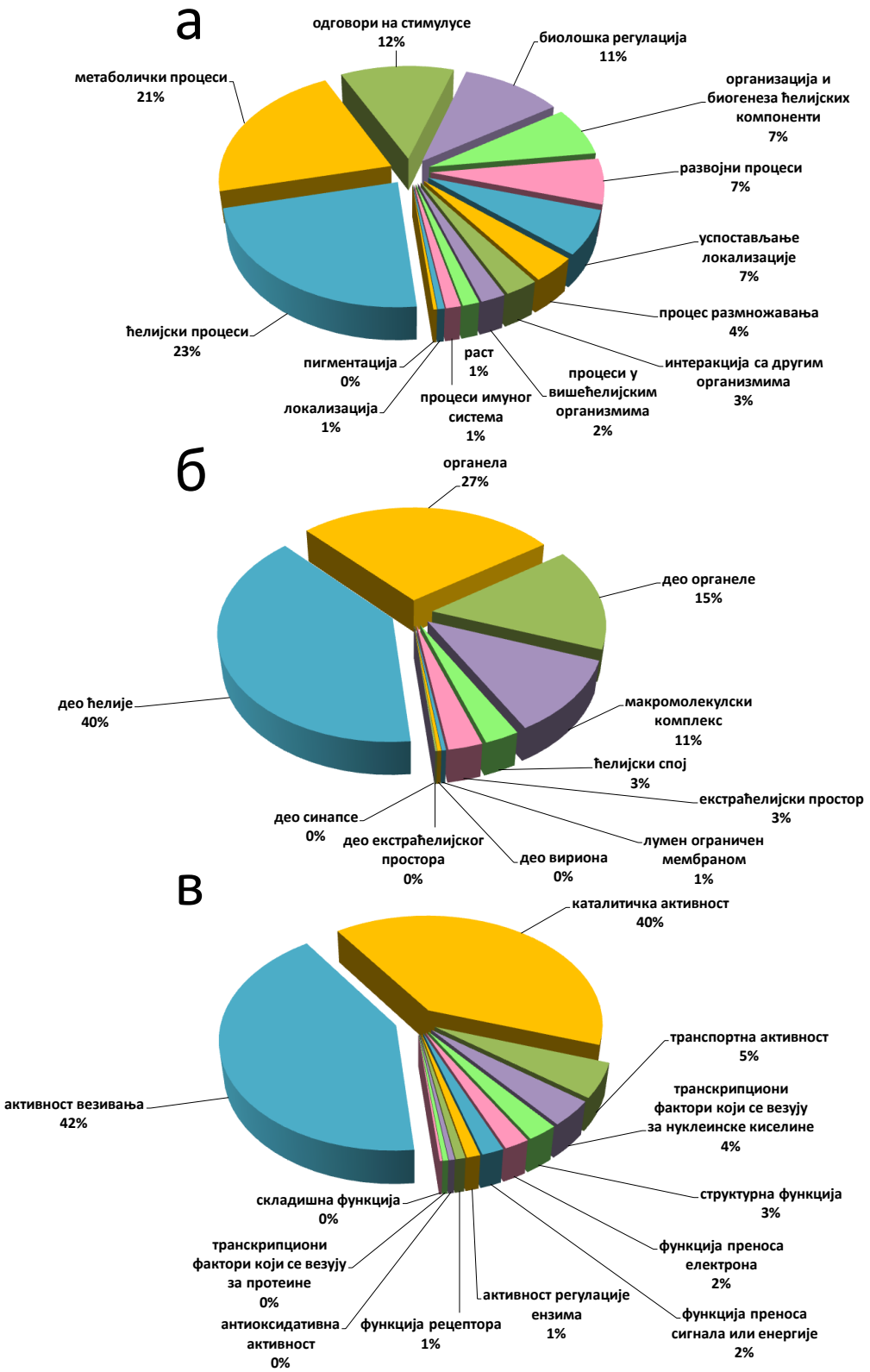
Од укупног броја анализираних секвенци, за 20668 секвенци утврђени су *GO* (*Gene ontology*) термини (Слика 29). Од тога, за 18060 секвенци одређена је припадност различитим биолошким процесима, за 17779 секвенци утврђена је припадност одређеним ћелијским компонентама, а за 16950 секвенци додељени су термини који одређују молекуларну функцију (други *GO* ниво).

Претрагом конзервираних функционалних домена која је обављена коришћењем *Pfam* базе података протеинских фамилија (Finn и сар., 2014), пронађено је 13379 секвенци које су у себи поседовале бар један домен (са 50 % минималном покривеношћу дужине домена). У табели 8 претстављено је 15 најчешћих *Pfam* фамилија.

За укупно 2158 секвенци одређени су *EC* бројеви, којих је било све заједно 523, и који су повезани са 146 *KEGG* метаболичких путева. Најзаступљенијих 30 *KEGG* метаболичких путева предсатављено је у табели 9. Међу идентификованим метаболичким путевима, 29 је припадало секундарном метаболизму.

Табела 8. Најчешћих 15 *Pfam* фамилија асемблираних секвенци врсте *S. fruticosa*.

Pfam приступни број	Pfam фамилија протеина	Укупан број асемблираних секвенци
PF13855	**LRR_8**	931
PF00069	**Pkinase**	737
PF01576	**Myosin_tail_1**	670
PF07714	**Pkinase_Tyr**	634
PF13041	**PPR_2**	577
PF13868	**Trichoplein**	423
PF00400	**WD40**	416
PF10174	**Cast**	410
PF05557	**MAD**	392
PF12799	**LRR_4**	377
PF01535	**PPR**	345
PF12796	**Ank_2**	322
PF12128	**DUF3584**	321
PF12854	**PPR_1**	317
PF00076	**RRM_1**	303



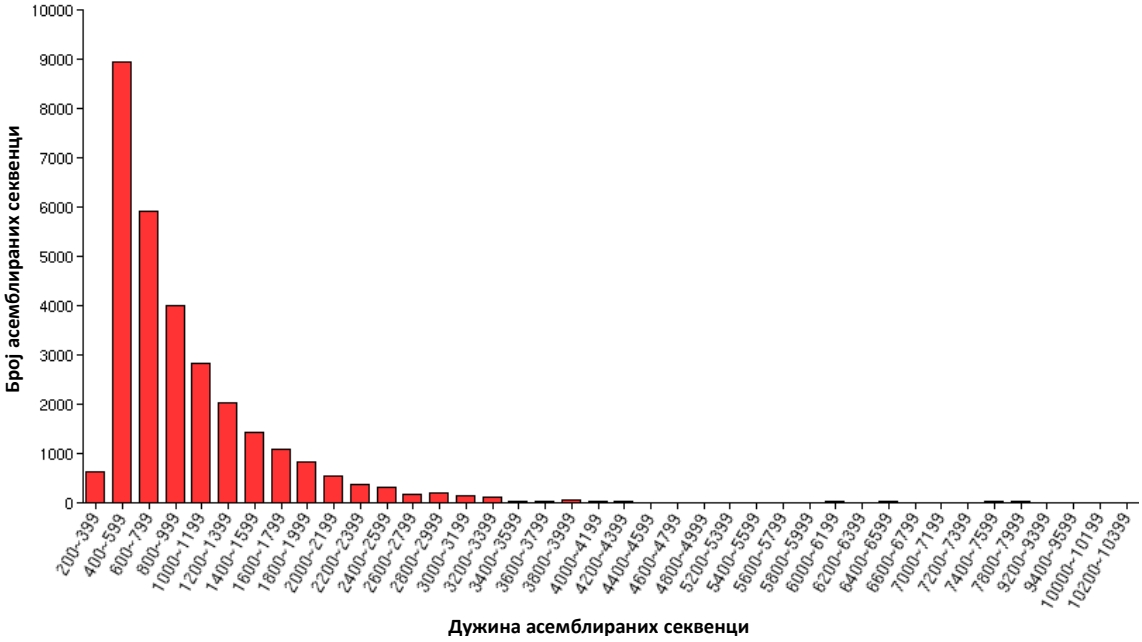
Слика 29. Онтологија гена (*Gene Ontology — GO*) за 29835 асемблираних секвенци врсте *S. fruticosa* установљена уз помоћ *Blast2GO* софтвера. Представљене су три *GO* категорије: **а**. биолошки процеси, **б**. ћелијска компонента, **в**. молекуларна функција.

Табела 9. 30 најзаступљенијих *KEGG* метаболичких путева асемблираних секвенци врсте *S. fruticosa*.

Метаболички пут	**Укупан број асемблираних секвенци**	**Број ензима**
Метаболизам пурина	654	53
Метаболизам скроба и сахарозе	444	40
Сигнални пут рецептора Т-ћелија	365	2
Метаболизам пиримидина	257	32
Биодеградација и метаболизам ксенобиотика	238	15
Метаболизам пирувата	232	25
Метаболизам тиамина	223	6
Метаболизам амино и нуклеотидних шећера	207	41
Гликолиза/глуконеогенеза	205	26
Метаболизам глицеролипида	197	21
Метаболизам фенилаланина	193	23
Биосинтеза фенилпропаноида	178	14
Фиксација угљеника код фотосинтетичких организама	171	21
Метаболизам галактозе	168	19
Сигнални систем фосфатидилинозитола	166	17
Метаболизам цистеина и метионина	163	37
Интерконверзија пентозе и глукуроната	163	16
Оксидативна фосфорилација	163	8
Метаболизам глицерофосфолипида	163	27
Метаболизам цијано-аминокиселина	150	14
Метаболизам глиоксилата и дикарбоксилата	144	29
Метаболизам глицина, серина и треонина	136	30
Метаболизам инозитол-фосфата	132	21
Биосинтеза флавоноида	131	13
Метаболизам триптофана	129	16
Метаболизам порфирина и хлорофила	127	31
Метаболизам метана	126	22
Метаболизам аргинина и пролина	123	36
Метаболизам глутатиона	123	17
Метаболизам алфа-линолеинске киселине	122	10

4.2.3.3. Функционална анализа асемблираних секвенци рузмарина

FastAnnotator интернет сервисом је анализирано укупно 48733 асемблираних секвенци. Дистрибуција секвенци по просечним дужинама приказана је на слици 30.



Слика 30. Дистрибуција просечних дужина асемблираних секвенци врсте *R. officinalis* добијених помоћу *454 GS FLX Titanium* платформе.

Од укупног броја анализираних секвенци, за 37944 секвенци утврђени су *GO* термини (Слика 31). Од тога, за 33047 секвенци одређена је припадност различитим биолошким процесима, за 33672 секвенци утврђена је припадност одређеним ћелијским компонентама, а за 31359 секвенци додељени су термини који одређују молекуларну функцију (други *GO* ниво).

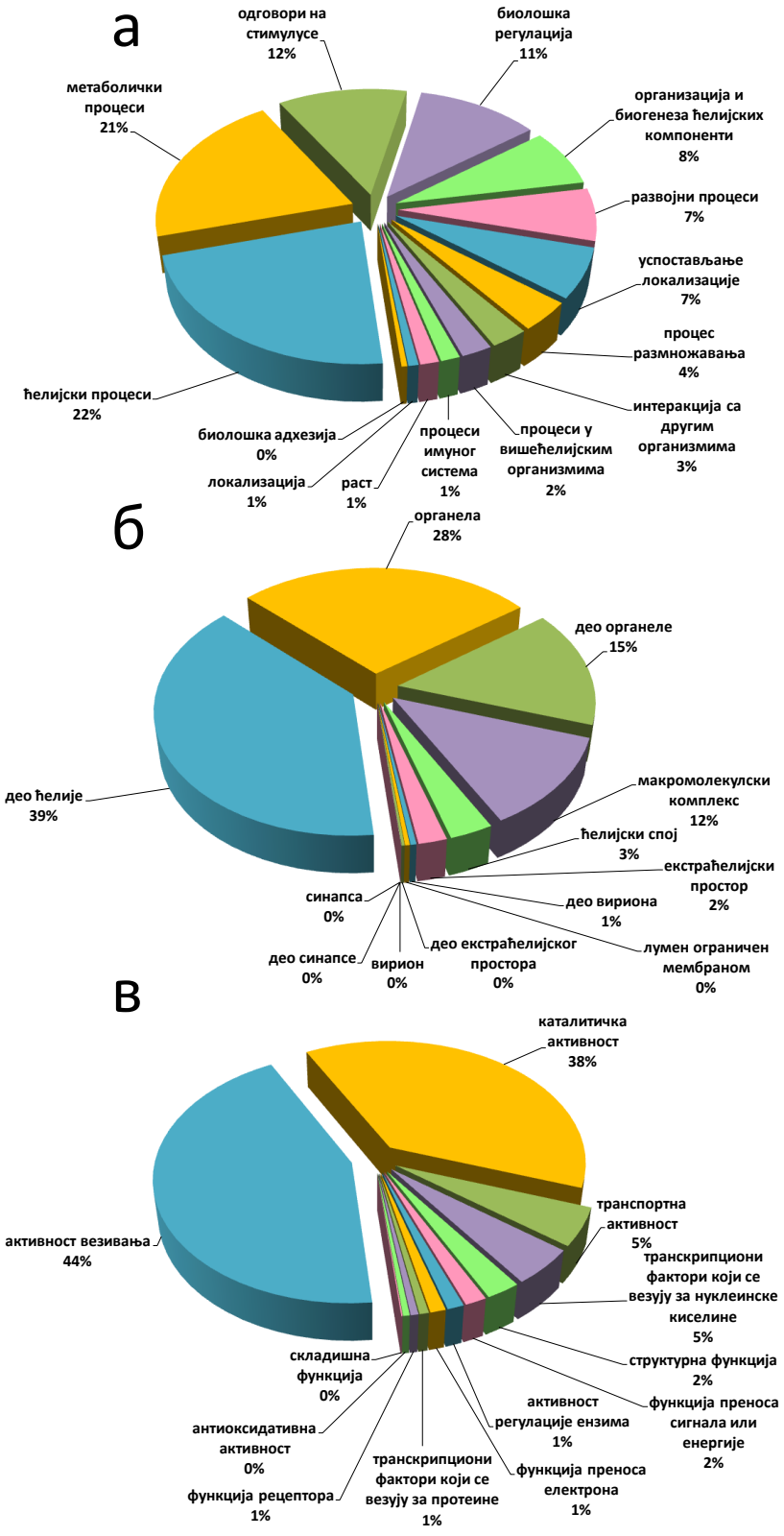
Претрагом конзервираних функционалних домена обављеном коришћењем *Pfam* базе података протеинских фамилија, пронађено је

29906 секвенци које су у себи поседовале бар један домен (са 50 *%* минималном покривеношћу дужине домена). У табели 10 претстављено је 15 најчешћих *Pfam* фамилија.

За укупно 5219 секвенци одређени су *EC* бројеви, којих је било све заједно 656, и који су повезани са 144 *KEGG* метаболичких путева. Најзаступљенијих 30 *KEGG* метаболичких путева предсатављено је у табели 11. Међу идентификованим метаболичким путевима, 33 је припадало секундарном метаболизму.

Табела 10. 15 најчешћих *Pfam* фамилија асемблираних секвенци врсте *R. officinalis*.

Pfam приступни број	Pfam фамилија протеина	Укупан број асемблираних секвенци
PF01576	**Myosin_tail_1**	2326
PF00069	**Pkinase**	1906
PF07714	**Pkinase_Tyr**	1657
PF00076	**RRM_1**	1596
PF14259	**RRM_6**	1406
PF10174	**Cast**	1349
PF13868	**Trichoplein**	1220
PF00400	**WD40**	1210
PF13893	**RRM_5**	1184
PF13041	**PPR_2**	1172
PF05557	**MAD**	1140
PF12128	**DUF3584**	1110
PF05701	**WEMBL**	972
PF09606	**Med15**	923
PF00769	**ERM**	855



Слика 31. Онтологија гена (*Gene Ontology — GO*) за 48733 асемблираних секвенци врсте *R. officinalis* установљена уз помоћ *Blast2GO* софтвера. Представљене су три *GO* категорије: **а**. биолошки процеси, **б**. ћелијска компонента, **в**. молекуларна функција.

Табела 11. 30 најзаступљенијих *KEGG* метаболичких путева асемблираних секвенци врсте *R. officinalis*.

Метаболички пут	**Укупан број асемблираних секвенци**	**Број ензима**
Метаболизам пурина	1011	56
Метаболизам скроба и сахарозе	663	42
Метаболизам пиримидина	532	33
Сигнални пут рецептора Т-ћелија	529	2
Гликолиза/глуконеогенеза	416	26
Метаболизам пирувата	334	28
Сигнални систем фосфатидилинозитола	331	19
Метаболизам глицеролипида	327	21
Метаболизам амино и нуклеотидних шећера	312	42
Метаболизам фенилаланина	312	24
Метаболизам глицерофосфолипида	310	29
Биодеградација и метаболизам ксенобиотика	297	16
Метаболизам цистеина и метионина	283	40
Биосинтеза фенилпропаноида	265	14
Метаболизам метана	261	23
Циклус лимунске киселине	252	19
Оксидативна фосфорилација	252	9
Метаболизам тиамина	246	7
Разградња валина, леуцина и изолеуцина	243	19
Фиксација угљеника код фотосинтетичких организама	241	21
Метаболизам инозитол-фосфата	238	21
Метаболизам аргинина и пролина	229	40
Метаболизам глутатиона	228	18
Метаболизам глицина, серина и треонина	222	31
Метаболизам галактозе	219	20
Пут пентозо-фосфата	219	17
Метаболизам триптофана	201	17
Разградња масних киселина	199	15
Метаболизам глиоксилата и дикарбоксилата	195	30
Интерконверзија пентозе и глукуроната	191	17

4.2.3.2. Идентификација гена кандидата за синтезу карнозинске киселине

Анализа *EST* базе података резултирала је идентификацијом секвенци које представљају потенцијалне кандидате за гене укључене у биосинтетски пут карнозичне киселине. Два контига из *EST* базе података грчке жалфије одговарала су већ окарактерисаним генима *SfCPS* и *SfKSL* (поглавље 4.1.). Реч је о контигу *Sfru.N01.C012304* и *Sfru.N01.C007690*. Такође, у *EST* бази података жлезданих длака рузмарина пронађене су секвенце хомологе са изолованим генима жалфије. Једна секвенца је изабрана као кандидат за *CPS* ген (*Roff.N01.C023303*), док су за *KSL* ген пронађена два кандидата (*Roff.N01.C024308* и *Roff.N01.C014868*). На основу већ познатих података о генима других биљних врста, претпостављено је да следеће кораке у биосинтетском путу до карнозичне киселине катализују ензими који припадају фамилији цитохром *P450* (*CYP*) монооксигеназа. У *EST* базама података пронађено је 9 секвенци грчке жалфије и 7 секвенци рузмарина које су изабране као највероватнији гени кандидати за кодирање *CYP* ензима (Табела 12).

Табела 12. Цитохром *P450* кандидати за синтезу карнозичне киселине и њихова анотација.

врста	*EST* контиг	анотација
S. fruticosa	*Sfru.N01.C007784/85*	*CYP71AxSf3*
	Sfru.N01.C002897	*CYP71AxSf1*
	Sfru-N01.C005075	*CYP71AySf1*
	Sfru.N01.C005693	*CYP72AxSf1*
	Sfru.N01.C007652/53	*CYP96xSf2*
	Sfru.N01.C012726	*CYP96xSf1*
	Sfru.N01.C013081	*CYP72xSf1*
	Sfru.N01.C001944	*CYP71DSf2*
	Sfru.N01.C002373	*CYP71ASf1*
	Sfru.N01.C016156/Sfru.N01.C021415	*CYP76Sf2*
R. officinalis	*Roff.N01.C033986*	*CYP71AxRo1*
	Roff.N01.C034529	*CYP71AyRo1*
	Roff.N01.C034470	*CYP72AxRo4*
	Roff.N01.C034550	*CYP72AxRo2*
	Roff.N01.C034293	*CYP96xRo1*
	Roff.N01.C034476	*CYP96xRo2*
	Roff.N01.C027381/82	*CYP72xRo1*
	Roff.N01.C021640	*CYP76Ro3*
	Roff.N01.C021643	*CYP76Ro4*

Анализа протеинских секвенци које одговарају генима кандидатима, показала је присуство региона карактеристичних за цитохром *P450* ензиме, у које спадају домен за везивање хем јединице, *PERF* мотив, *KETLR* мотив и место за везивање O_2 (Табела 13).

Табела 13 Протеински региони карактеристични за цитохроме *P450*, пронађени у секвенцама изабраних кандидата.

Назив региона	Секвенца
Домен за везивање хем јединице	F(G/N)xG(R/P)RxCxG
***PERF* мотив**	PxR(F/W)
***KETLR* мотив**	xExxRx
Место за везивање O_2	(A/G)Gx(E/D)(T/S)(T/S)

4.3. Изолација и функционална карактеризација цитохрома *P450* грчке жалфије и рузмарина потенцијално укључених у синтезу карнозичне киселине

4.3.1. Изолација и анализа секвенци цитохрома *P450* грчке жалфије

Цитохром *P450* кандидати успешно су изоловани из цДНК жлезданих длака грчке жалфије. Слика 32 приказује упоређене секвенце протеина које транслирају изоловани гени, са означеним регионима карактеристичним за цитохром *P450* монооксигеназе. У наставку су детаљније описани сви изоловани гени, а у поглављу Прилог (Слике П1-П15) се налазе и све генске секвенце.

Sfru.N01.C002897 (CYP71AxSf1): Изолована секвенца разликовала се у само 3 амино киселине од почетног контига *Sfru.N01.C002897*. ОРФ гена састоји се од 1398 базних парова, односно 466 амино киселине (Слика П1).

Sfru.N01.C007784/85 (CYP71AxSf3): Контиг *Sfru.N01.C007784* и *Sfru.N01.C007785* међусобно се разликују у само једној амино киселини, па

се могу посматрати као варијанте истог гена. Прајмери су дизајнирани тако да се везују за обе секвенце. Први покушај изолације пуне дужине гена резултирао је у добијању секвенце која се разликовала од оба почетна контига, али је сличност и даље била висока (идентичност секвенце- 98,8 *%*). Због тога је и задржан назив ове секвенце по почетној анотацији- *CYP71AxSf3*. ОРФ овог гена састоји се од 1509 базних парова, а протеин који кодира чини 502 амино киселине (Слика П2). Након овог, уследио је још један покушај изолације контига *Sfru.N01.C007784/85*. Секвенца која је добијена том приликом показивала је већу сличност са контигом *Sfru.N01.C002897* (97,12 *%* идентичност) него са почетним контигом (86,34 *%* идентичност). Та секвенца названа је *CYP71AxSf4*, и чини је ОРФ од 1497 базних парова или 498 амино киселина (Слика П3).

Sfru.N01.C007652/53 (CYP96xSf2): Контизи *Sfru.N01.C007652* и *Sfru.N01.C007653* идентични су у свом аминокиселинском саставу, па су сматрани истим геном приликом изолације. Први покушај изолације гена резултирао је умножавањем секвенце која се разликује донекле од контига у аминокиселинском саставу (98,73 *%* идентичност секвенци). Резултат поновљене амплификације био је добијање секвенце идентичне са контигом. Ова секвенца је дефинитивно названа *CYP96xSf2*, и дужина јој је 1491 *bp*/496 *ak*, док је претходно изолована добила назив *CYP96xSf3*, и њен ОРФ чини 1485 *bp*/494 *ak* (Слике П4 и П5).

Sfru.N01.C016156/Sfru.N01.C021415: Поређење са *NCBI* базом података указало је на могућност да два контига представљају делове једног истог гена, при чему се контиг *Sfru.N01.C016156* налази на 5' крају, а *Sfru.N01.C021415* на 3'крају секвенце. То је и потврђено након успешне амплификације *PCR* техником гена у пуној дужини, а уз помоћ прајмера дизајнираних на основу секвенца оба контига. Изолован је ген чији су почетни и завршни делови били идентични контизима, а дужина му је била 1479 *bp* тј. 492 *ak*. Ген је анотиран као *CYP76AAxSf2* (Слика П6).

Sfru-N01.C005075 (CYP71AySf1): Разлика између изоловане секвенце и контига огледала се само у две амино киселине. ОРФ чини 1500 базних парова, тј. 499 амино киселина (Слика П7).

Sfru.N01.C005693 (CYP72AxSf1): Изолована секвенца разликовала се од контига у само једној амино киселини и њен ОРФ је био дужине 1326 базних парова, тј. 441 амино киселину (Слика П8).

Sfru.N01.C008404 (CYP72AxSf2): Сличност изоловане секвенце у односу на контиг веома је висока (99,42 % идентичност). Дужина гена је 1557 *bp*, док је дужина транслираног протеина 518 амино киселина (Слика П9).

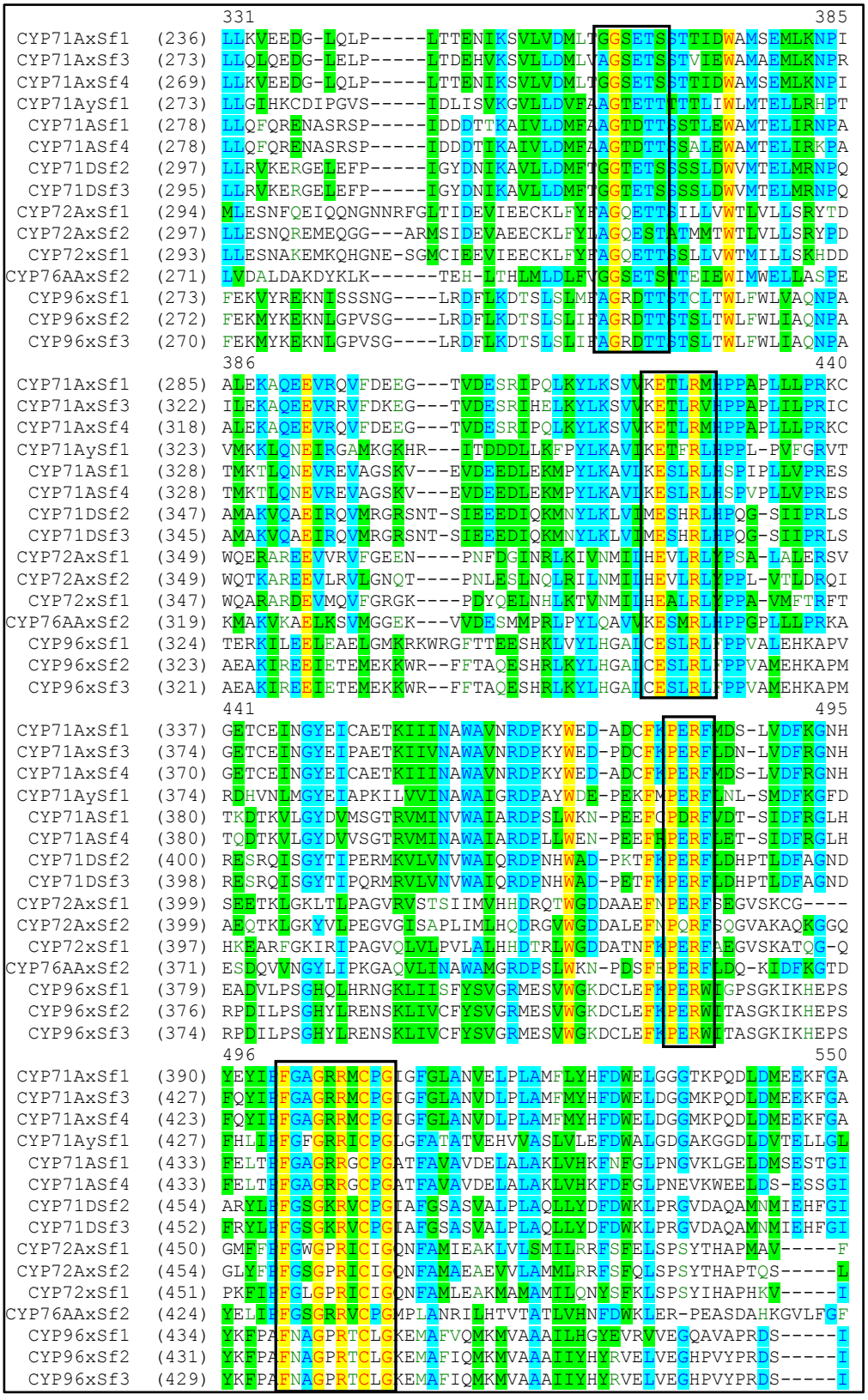
Sfru.N01.C012726 (CYP96xSf1): Разлика у аминокиселинском саставу између изоловане секвенце и контига огледала се у само две амино киселине. ОРФ гена чини 1490 *bp*, односно 499 *ak* (Слика П10).

Sfru.N01.C013081 (CYP72xSf1): Изолована је секвенца која одговара контигу, уз само 2 разлике у аминокиселинском саставу. Дужина протеина је била 515 амино киселина (1548 *bp*) (Слика П11).

Sfru.N01.C001944 (CYP71DSf2): Изолација гена резултирала је добијањем две различите секвенце. Једну је одликовала висока хомологија са контигом *Sfru.N01.C001944* (98,5 % идентичност секвенци), и њен ОРФ је чинило 1584 базних парова, тј. 527 амино киселина (Слика П12). Друга изолована секвенца показала је већу сличност са контигом *Sfru.N01.C001949* (99,62 %), означена је као *CYP71DSf3*, а њен ОРФ је чинило 1578 базних парова, тј. 525 амино киселина (Слика П13).

Sfru.N01.C002373 (CYP71ASf1): И у случају контига *Sfru.N01.C002373*, као резултат *PCR* амплификације добијене су две различите секвенце. Једна је показала велику сличност са полазним контигом (97,22 *%* идентичност), док је друга показала сличност са контигом *Sfru.N01.C002378* (97,22 *%* идентичност), и названа је

CYP71ASf4. Дужина ОРФ-а гена *CYP71Asf1* и *CYP71Asf4* била је 1515 *bp* (504 *ak*) и 1512 *bp* (503 *ak*), редом (Слике П14 и П15).



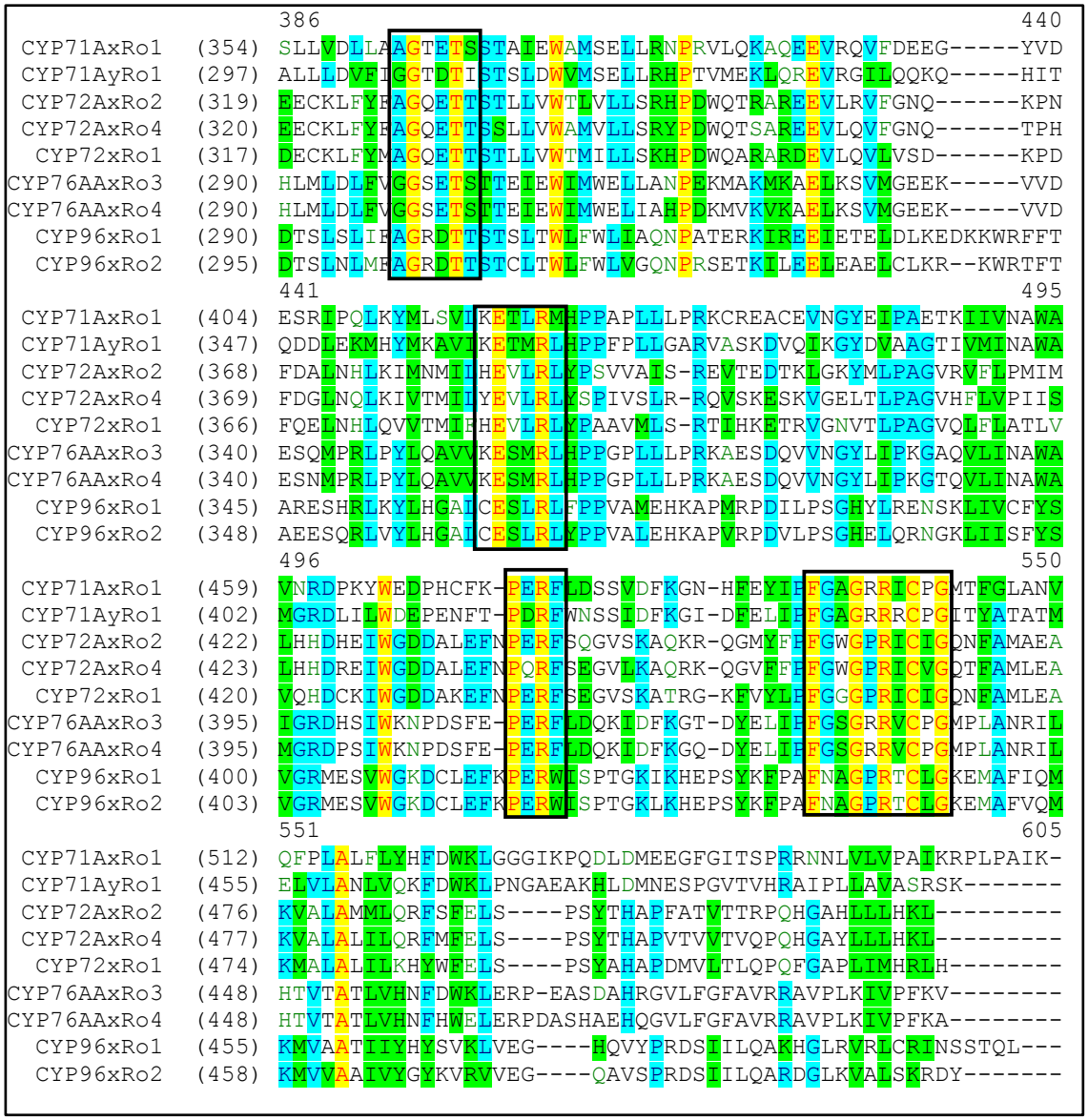
Слика 32. Упоређене протеинске секвенце изолованих цитохрома *P450* грчке жалфије. Конзервисани региони су уоквирени (место за везивање O_2, *PERF* мотив, *KETLR* мотив и домен за везивање хем јединице, редом).

4.3.2. Изолација и анализа секвенци цитохрома *P450* рузмарина

Секвенце *Roff.N01.C033986 (CYP71AxR01), Roff.N01.C034529 (CYP71AyR01), Roff.N01.C034550 (CYP72AxR02), Roff.N01.C034470 (CYP72AxR04), Roff.N01.C034293 (CYP96xR01), Roff.N01.C034476 (CYP96xR02), Roff.N01.C027381/82 (CYP72xR01), Roff.N01.C021640 (CYP76AAxR03)* и *Roff.N01.C021643 (CYP76AAxR04)* успешно су изоловане из цДНК жлезданих длака рузмарина. Дужине гена и одговарајућих протеина наведене су у табели 14, генске секвенце налазе се у прилогу (Слике П16-П24), а високо конзервисани региони су означени у приказу поређења протеинских секвенци (Слика 33).

Табела 14. Дужине изолованих цитохром *P450* гена рузмарина и протеина које они кодирају..

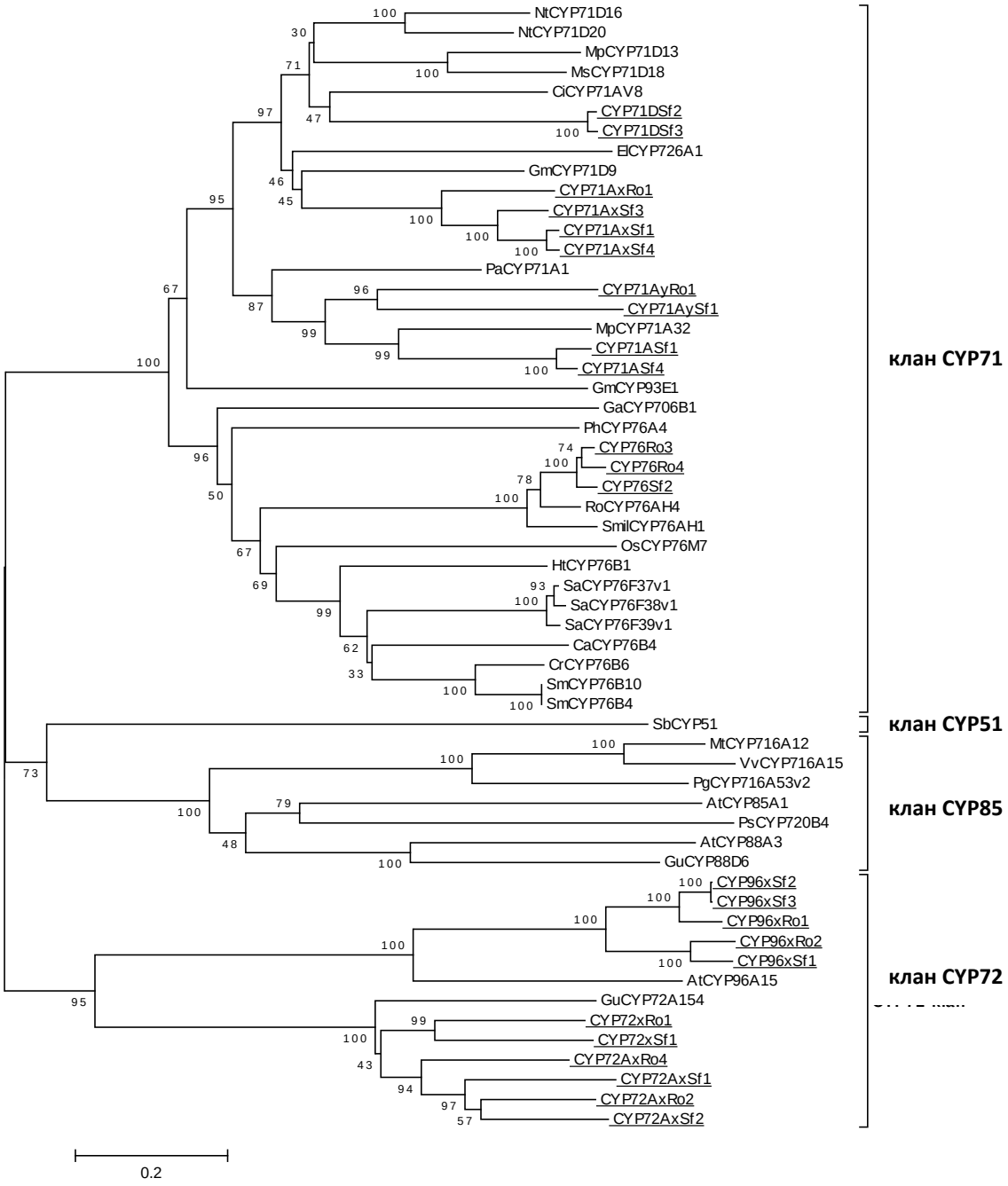
назив	Број базних парова	Број амино киселина
CYP71AxRo1	1698	565
CYP71AyRo1	1509	502
CYP72AxRo2	1554	517
CYP72AxRo4	1557	518
CYP72xRo1	1506	501
CYP76AAxRo3	1482	493
CYP76AAxRo4	1485	494
CYP96xRo1	1509	502
CYP96xRo2	1551	516



Слика 33. Упоређене протеинске секвенце изолованих цитохрома *P450* рузмарина. Конзервисани региони су уоквирени (место за везивање O_2, *PERF* мотив, *KETLR* мотив и домен за везивање хем јединице, редом).

4.3.3. Филогенетска анализа изолованих цитохрома *P450*

Филогенетско стабло конструисано *Neighbor–Joining* методом, помоћу *MEGA 5* софтвера, уврстило је цитохром *P450* кандидате у неколико различитих фамилија (Слика 34). Највећи број кандидата припада CYP71 фамилији, добро познатој по својој улози у метаболизму терпена. У овиру ове фамилије, протеини кандидати груписали су се у неколико одвојених подгрупа. CYP71DSf2 и CYP71DSf3 филогенетски су били најближи валенцен оксидази врсте *Cichorium intybus* (CiCYP71AV8; Cankar и сар., 2011). Овај ензим врши хидроксилацију *C2* позиције (+)-валенцена, производећи транс-нооткатол, који даље може бити оксидован до (+)-нооткатона. Ензими CYP71AxR01, CYP71AxSf3, CYP71AxSf1 и CYP71AxSf4 показали су највећу сличност са цитохромом *P450* потенцијално укљученим у биосинтетски пут глицеолина соје (GmCYP71D9; Latunde-Dada и сар., 2001). CYP71AyR01, CYP71AySf1, CYP71ASf1 и CYP71ASf4, грписали су се заједно са ментофуран синтазом питоме нане (MpCYP71A32; Bertea и сар., 2001), а сродан им је и ензим авокада (PaCYP71A1; Bozak и сар., 1990), који врши епоксидацију нерола и гераниола. Клану CYP71 припадају и ензими CYP76R03, CYP76R04 и CYP76Sf2, који су се јасно груписали са окарактерисаним CYP76 ензимима породице Lamiaceae, RoCYP76AH4 и SmCYP76AH1, који врше синтезу феругинола од милтирадиена (Guo и сар., 2013; Zi и Peters, 2013). Протеини CYP96xSf2, CYP96xSf3, CYP96xR01, CYP96xR02 и CYP96xSf1 сродни су са цитохромом *P450* врсте *Arabidopsis thaliana* (AtCYP96A15; Greer и сар., 2007), чија је улога синтеза секундарних алкохола и кетона у кутикуларном воску изданка. CYP72xR01, CYP72xAR02, CYP72AxR04, CYP72xSf1, CYP72AxSf1 и CYP72AxSf2 показали су велику хомологију са цитохром *P450* ензимом врсте *Glycyrrhiza uralensis*, који учествује у синтези глициризина (GuCYP72A154; Seki и сар., 2011).



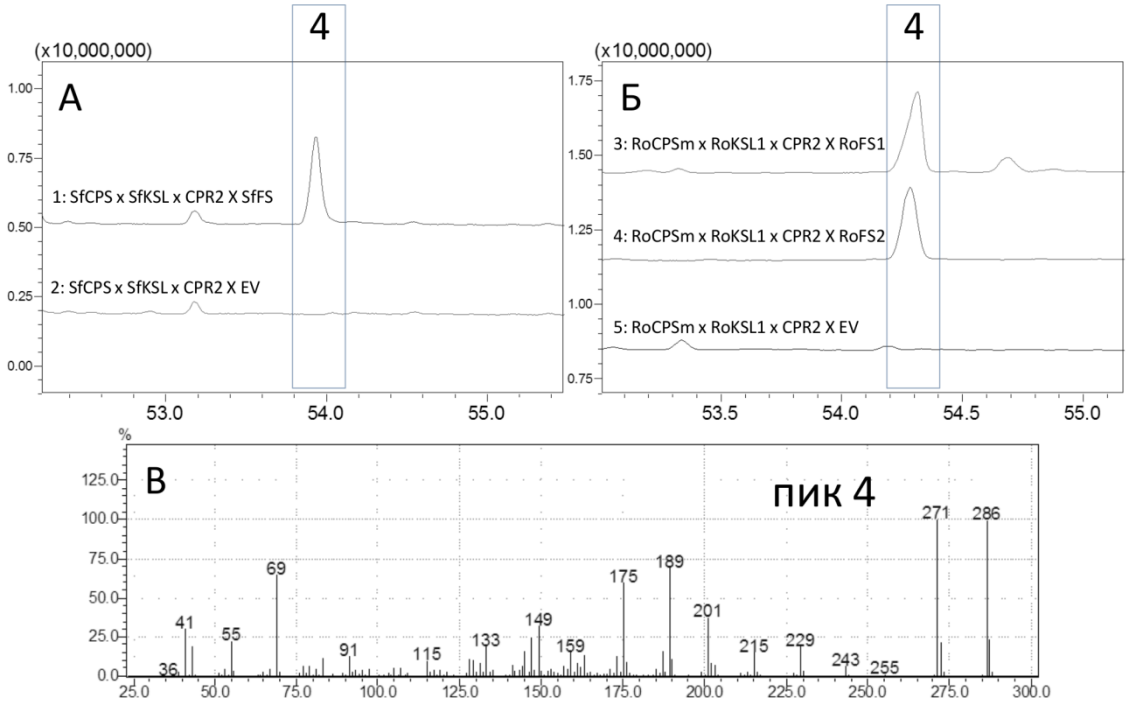
Слика 34. Филогенетска анализа цитохром *P450* кандидата која представља њихову повезаност са осталим биљним цитохромима *P450* укљученим у синтезу терпена. Филогенетско стабло је конструисано на основу neighbor-joining методе користећи *MEGA 5* софтвер (Tamura и сар., 2011). Описи скраћеница назива протеина и њихови идентификациони бројеви наведени су у Табели П2 Прилога.

4.3.4. Функционална карактеризација изолованих цитохрома *P450*

4.3.4.1. Функционална карактеризација феругинол синтаза грчке жалфије и рузмарина у квасцима

За испитивање активности цитохром *P450* монооксигеназа коришћени су есеји експресије у квасцима. У ту сврху, различити сојеви квасаца који производе милтирадиен као прекурсор - *AM104-1* и *AM113-1* (поседовали су конструкте са *SfCPS* и *SfKSL* генима), и *AM113-4* (са *RoCPSm* и *RoKSL1f* генима), додатно су трансформисани векторима који су носили цДНК гена кандидата[8]. Сви сојеви додатно су били трансформисани и цитохром *P450* редуктазом (CPR2), потребном за каталитичку активност цитохрома *P450*. Након периода инкубације, течне културе су екстраховане хексаном и екстракти су анализирани *GC-MS* методом. На овај начин је утврђено, да један ген из грчке жалфије (*CYP76Sf2*), и два гена из рузмарина (*CYP76R03* и *CYP76R04*), користећи милтирадиен као супстрат, катализују синтезу првог фенолног једињења у биосинтетском путу карнозинске киселине, феругинола. Ново једињење идентификовано је на основу поређења са *Wiley* базом података масених спектара, а цитохроми *P450* именовани су као SfFS (*Salvia fruticosa ferruginol synthase*), RoFS1 и RoFS2 (*Rosmarinus officinalis ferruginol synthase 1* и *2*)(Слика 35).

[8] Све сојеви описани су у одељку Материјал и методе.



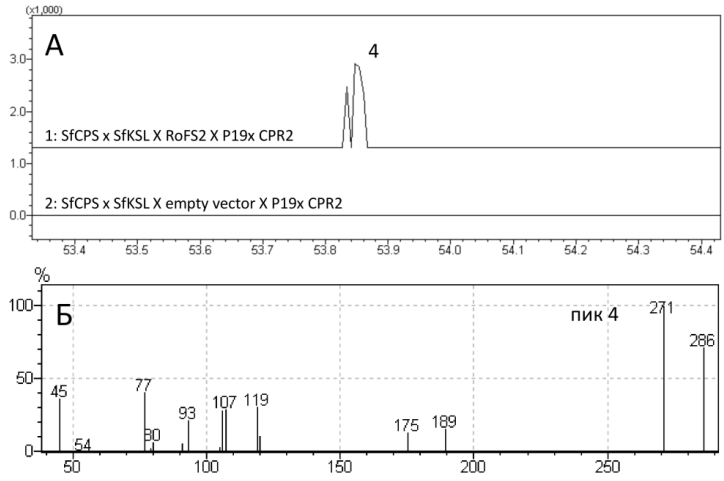
Слика 35. Хетерологa експресија гена за феругинол синтазу у квасцу *(S. cerevisiae)*. **А**, *GC-MS* хроматограми производа квасаца трансформисаних са **1**, *SfCPS, SfKSL* и *SfFS* (*CYP76AAxSf2*) и **2**, *SfCPS, SfKSL* и празан вектор pWTDH3myc. **Б**, *GC-MS* хроматограми производа квасаца трансформисаних са **3**, *RoCPSm*, *RoKSL1f* и *RoFS1* (*CYP76AAxRo3*), **4**, *RoCPSm*, *RoKSL1f* и *RoFS2* (*CYP76AaxRo4*), и **5**, *RoCPSm*, *RoKSL1f* и празан вектор pWTDH3myc. **4**, Пик који одговара феругинолу. **С**, Масени спектар пика **4**.

4.3.4.2. Функционална карактеризација изолованих цитохром *P450* монооксигеназа привременом експресијом у дувану *(Nicotiana benthamiana)*

4.3.4.2.1. Функционална карактеризација феругинол синтаза у дувану *(Nicotiana benthamiana)*

Следећи корак у испитивању активности феругинол синтаза грчке жалфије и рузмарина били су *in planta* есеји привремене експресије. Обављена су два експеримента, од којих је првим испитана каталитичка активност феругинол синтазе грчке жалфије. цДНК гена *SfFS* клонирана је у бинарни вектор за експресију, и као таква, уведена у бактерију *Agrobacterium tumefaciens*. Листови врсте *Nicotiana benthamiana*

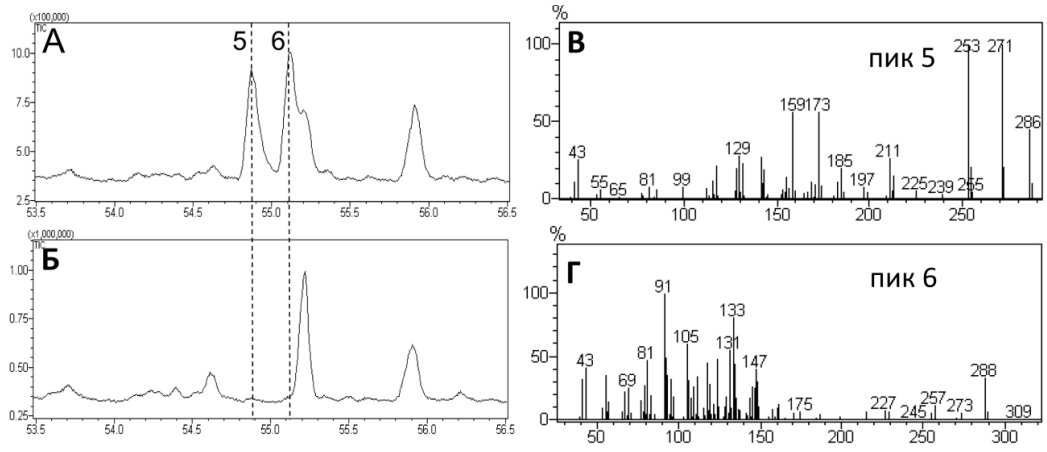
инокулисани су затим мешавином култура бактерије *A. tumefaciens* које су садржале наведене конструкте, а такође и гене *SfCPS* и *SfKSL*. Након пет дана, инокулисани листови екстраховани су хексаном. Екстракти су анализирани *GC-MS* техником. Анализа хроматограма није резултирала детекцијом пика за феругинол. Из тог разлога, обављен је сличан експеримент, у којем су, уз испитиване гене, листови дувана инокулисани и конструктом који је носио ген за протеин p19, како би дошло до супресије биљног „*gene silencing*" одговора. Такође, листови су инокулисани и конструктом који је носио ген за цитохром *P450* редуктазу врсте *Arabidopsis thaliana* (*AtCPR1*, *NCBI* референтни број: NP_194183.1). Уз ген *SfFS*, том приликом испитани су и *RoFS1* и *RoFS2* гени. Листови врсте *N. benthamiana* инокулисани су мешавином култура бактерије *A. tumefaciens* које су садржале наведене конструкте. Инокулисани листови су након пет дана екстраховани хексаном, а добијени екстракти су анализирани *GC-MS* техником. Анализом хроматограма, мали пик феругинола уочен је само у случају истовремене експресије гена *SfCPS, SfKSL* и *RoFS2* (слика 36), док у случају гена *SfFS* и *RoFS1*, никакав производ ензимске реакције није детектован.



Слика 36. Производња феругинола у листовима врсте *Nicotiana benthamiana*.. **А**, *GC-MS* профил (286 *m/z* екстрахован хроматограм) листова врсте *N. benthamiana* инокулисаних назначеним генима. **1.** хроматограм који приказује пик феругинола настао активношћу гена *SfCPS*, *SfKSL* и *RoFS2,* уз помоћ гена *P19* и *AtCPR2*. **2**. негативна контрола. **В**, Масени спектар пика 4 (феругинол).

4.3.4.2.2. Испитивање активности CYP71 кандидата у дувану *(Nicotiana benthamiana)*

Након установљавања да припадници CYP76 породице грчке жалфије и рузмарина имају активност феругинол синтаза, започет је процес испитивања активности и осталих гена кандидата. У ту сврху, коришћена је метода обједињеног прелиминарног тестирања, која подразумева истовремену инокулацију листова *N. benthamiana* са више гена истовремено. Појединачно тестирање сваког гена кандидата понаособ уследило би тек након уочавања активности детекцијом пика на хроматограму. У оквиру ове дисертације, извршено је једно прелиминарно тестирање, које је обухватало гене припаднике *CYP71* породице, прецизније гене *CYP71AyR01, CYP71AySf1, CYP71AxR01, CYP71AxSf1* и *CYP71AxSf3*. цДНК ових гена клонирана је у бинарни вектор за експресију, и затим уведена у бактерију *A. tumefaciens*. Листови врсте *N. benthamiana* истовремено су затим инокулисани мешавином култура бактерије *A. tumefaciens* које су садржале наведене конструкте, а такође и гене *SfCPS, SfKSL* и *SfFS*. Након пет дана, инокулисани листови екстраховани су хексаном. Екстракти су анализирани *GC-MS* техником, што је резултирало уочавањем два нова пика на гасном хроматограму (Слика 37).



Слика 37. Анализа хексанских екстраката листова врсте *Nicotiana benthamiana* инокулисаних изабраним CYP генима кандидатима. **А**, *GC-MS* профил листова инокулисаних генима *SfCPS, SfKSL, SfFS, CYP71AyR01, CYP71AySf1, CYP71AxR01, CYP71AxSf1* и *CYP71AxSf3*. **Б**. *GC-MS* профил листова инокулисаних генима *SfCPS*, *SfKSL* и *SfFS*. **В**, Масени спектар пика 5. **Г**, Масени спектар пика 6.

То је указало на то да један или више тестираних гена кодира ензим који је у стању да користи неки од супстрата присутних у трансформисаним листовима дувана. Молекулска маса једињења којем је одговарао пик 1, била је идентична маси феругинола (286 *Da*), међутим мала разлика у изгледу масеног спектра указала је да је ипак реч о неком другом једињењу, које такође настаје хидроксилацијом абиетатриена. Само на основу масеног спектра, није било могуће утврдити прецизно на ком од угљеника се десила оксидација. За једињење којем одговара пик 2, на основу масеног спектра и молекулске масе (288 *Da*), може се претпоставити да такође настаје хидроксилацијом. Међутим, резултати указују на то да је супстрат у овој реакцији милтирадиен. Ни у овом случају, позиција хидроксилације није позната.

5
Дискусија

Карнозинска киселина, у многим досадашњим истраживањима, показала је бројне биолошке активности и самим тим и велики потенцијал за примену у фармацеутској индустрији. Уз то, карнозинска киселина последњих деценија показује велики значај за индустрију хране, а такође и за производњу различитих козметичких препарата. Тренутно, једини начин за добијање карнозинске киселине јесте њена екстракција из биљног ткива, за шта је неопходна велика количина биљног материјала. Најчешће се за екстракцију користи рузмарин, биљка релативно ниског приноса. Количина карнозинске киселине коју је могуће изоловати из биљног материјала је релативно ниска, и зависи од многих фактора. На садржај карнозинске киселине утиче у великој мери генетски профил биљака, али не мање значајни су и услови под којима се биљке гаје. На крају, пречишћавање и добијање чисте супстанце је тежак и компликован процес. Због свега тога, јавља се велика потреба за алтернативним и унапрђеним техникама производње овог вредног једињења. Изучавање биосинтезе карнозинске киселине на молекуларном нивоу отвара нове могућности у погледу побољшања биљне продуктивности коришћењем биотехнолошких метода. Познавање гена биосинтетског пута карнозинске киселине омогућава повећану продукцију овог дитерпена у аутологом домаћину, употребом генетских модификација. Такође, коришћење метода синтезе карнозинске киселине у хетерологим домаћинима постаје на овај начин могуће.

Идентификација гена одређених биосинтетских путева, коришћењем података о транскриптому изолованих жлезданих длака, успешно је спроведена код многих биљних врста. *EST* база података оформљена за жлездане длаке питоме нане (*Mentha* x *piperita*) омогућила је, у периоду од само неколико година, клонирање и карактеризацију свих гена укључених у биосинтетски пут монотерпена *p*-ментана (Bertea и сар., 2001; K. Ringer, 2003; Davis и сар., 2005; K. L. Ringer и сар., 2005). Такође, успешно су идентификовани и гени пластидног *MEP* пута којим се синтетишу прекурсори терпена (Lange и сар., 1998; Lange и Croteau, 1999). Даље, на основу података о *EST* секвенцама босиљка (*Ocimum basilicum*) (D R Gang и

сар., 2001) идентификоване су и окарактерисане функције гена који кодирају монотерпен синтазе (*β*-мирцен, терпинолен, (+)-линалоол и гераниол синтазе) и сесквитерпен синтазе (гермакрен *D*, *α*-зингиберин и *γ*-кардинен синтазе, између осталог) (Iijima, Davidovich-Rikanati, и сар., 2004; Iijima, Gang, и сар., 2004). Слична *EST* база података оформљена је и за оригано (*Origanum vulgare*), што је омогућило идентификацију гена и потврду функција три монотерпен и три сесквитерпен синтазе (Crocoll и сар., 2010). Ензим *β*-феландрен синтаза из лаванде (*Lavandula angustifolia*) такође је окарактерисан коришћењем сличног принципа (Demissie и сар., 2011). Осим горе поменутих *EST* база података за врсте које припадају породици *Lamiaceae*, постоје подаци о транскриптому жлезданих длака и за припаднике неколико других биљних породица, који су такође представљали основу за проналажење гена терпенских биосинтетских путева. Секвенционирање жлезданих длака неколико припадника породице *Solanaceae* (*Solanum lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. pennellii* и *Nicotiana tabacum*), показало се плодоносним за изолацију више биосинтетских гена монотерпена и сесквитерпена (Fei и сар., 2004; Leonhardt и сар., 2009; Schilmiller и сар., 2009; Harada и сар., 2010; Bleeker и сар., 2011; H. Cui и сар., 2011; McDowell и сар., 2011). Секвенционирање транскриптома жлезданих длака врсте *Artemisia annua* из породице *Asteraceae* (Wei Wang и сар., 2009; Weathers и сар., 2011), омогућило је расветљавање пута биосинтезе артемизинина, битне компоненте савремене формулације за лечење маларије (Sinclair и сар., 2009). Значајно је и секвенционирање жлезданих длака врсте *Cistus creticus* (*Cistaceae*), које је резултирало карактеризацијом гермакрен C и копал-8-ол дифосфат синтазе (Falara и сар., 2008, 2010). Коначно, секвенционирање је обављено и на жлезданим длакама две врсте породице *Cannabaceae*, *Humulus lupulus* (хмељ) и *Cannabis sativa* (конопља), што је довело до изолације неколико гена биосинтетских путева терпена (G. Wang и сар., 2008; Marks и сар., 2009; Taura и сар., 2009; Wei Wang и сар., 2009).

На сличан начин као у наведеним истраживањима, у овој дисертацији описана је анализа транскриптома жлезданих длака грчке жалфије и

рузмарина, комбинована са компаративном метаболиком, која се показала као користан приступ за изолацију гена биосинтетског пута карнозинске киселине. Оваква методологија омогућила је идентификацију и карактеризацију гена који учествују у биосинтези прва три прекурсора биосинтетског пута овог једињења. Уз то, изоловани су и додатни гени кандидати, потенцијално одговорни за следеће кораке у ланцу реакција. Ово не само да је начинило основу за даља испитивања биосинтетског пута карнозинске киселине, већ и значајно доприноси широкој области која се бави истраживањем терпен синтаза биљака.

5.1. SfCPS катализује синтезу копалил дифосфата

цДНК библиотека жлезданих длака листова биљке *S. fruticosa* (Chatzopoulou и сар., 2010) омогућила је идентификацију секвенце за коју се претпоставило да би могла да обавља функцију копалил дифосфат синтазе. Филогенетска анализа изоловане цДНК гена кандидата указала је на његову сродност са генима за CPS других биљака, док је анализом секвенце кодираног протеина идентификован високо конзервирани *DxDD* мотив богат аспартатом, карактеристичан за дитерпен синтазе класе II. Због тога је претпостављено да и SfCPS катализује реакцију карактеристичну за све ензиме класе II, а која је иницирана протонацијом супстрата. У овој реакцији, супстрат је *GGDP*, док *CDP* настаје као производ реакције. За потврду активности дитерпен синтазе, коришћен је приступ који користи експресију у *E. coli* за добијање довољне количине испитиваног протеина. Синтетисани протеин је коришћен у ензимском есеју, уз присуство *GGDP*. Потенцијални производ реакције, *CDP*, поседује дифосфатну групу, и као такав не може бити детектован *GC-MS* анализом. Због тога је производ ензимског есеја конвертован из дифосфата у алкохол употребом алкалне фосфатазе. На тај начин, *CDP* је конвертован у копалол, дефосфорилисани копалил дифосфат, а копалол је успешно детектован *GC-MS* анализом. Тиме је урађена коначна потврда функције изолованог гена *SfCPS*, и доказано да се ради о дитерпен синтази.

Сличну реакцију циклизације једињења *GGDP* катализују и многи други CPS ензими, а производ може бити један од три стереоизомера *CDP*, *ent-*, *syn-* и *normal-CDP* (Peters, 2010). Стереоизомер који се најчешће јавља код биљака јесте *ent-CDP*. Велики број терпен синтаза класе II одговорних за ову рекцију до сад је описано, а *CDP* у тој конформацији најчешће је прекурсор гиберелина, биљних хормона, док остале конформације дају прекурсоре за једињења секундарног метаболизма (Peters, 2010). *Normal*-конформација *CDP*-а је најзаступљенија, и познато је неколико ензима који су за њу специфични (Vogel и сар., 1996; Schepmann и сар., 2001; Martin и сар., 2004; Ro и Bohlmann, 2006; Tomonobu Toyomasu и сар., 2008; Gao и сар., 2009), док је *syn*-конформација изузетно ретка. Интересантно је да код пиринча, једна од *ent-CDP* синтаза (OsCPS4) не учествује у синтези гиберелина, већ лабданских дитерпена (Prisic и сар., 2004). Конформација се након првог корака циклизације ензимом класе II ретко мења, па је на основу чињенице да карнозинску киселину одликује *normal*-конформација, претпостављено да се и њена синтеза одвија преко таквог прекурсора. Такође, недавно је идентификован и ензим SmCPS, *CDP* синтаза биљке *Salvia miltiorrhiza* (кинеска жалфија), која је прекурсор у синтези таншинона. Биосинтеза ових дитерпена одвија се највероватније преко карнозинске киселине, а производ активности ензима SmCPS јесте *CDP normal*-стереохемије. Све то представљало је јасну индикацију да и код грчке жалфије можемо очекивати исти случај. Међутим, тек карактеризацијом следећег ензима у низу дефинитивно је потврђена конформација синтетисаног копалил дифосфата.

Анализе сродности показале су блиске филогенетске везе ензима SfCPS са другим дитерпен синтазама класе II које учествују у синтези секундарних метаболита. Осим SmCPS ензима кинеске жалфије, веома близу ензиму SfCPS на филогенетском стаблу налазе се и ензими укључени у синтезу копал-8-ол дифосфата (лабда-13-ен-8-ол дифосфат) из врста *S. sclarea* (SsLPPS), *Cistus creticus* (CcCLS) и *Nicotiana tabacum* (NtCPS2) (Falara и сар., 2010; Caniard и сар., 2012; Sallaud и сар., 2012). Сви ови ензими катализују синтезу дифосфатних дитерпена *normal*-стереохемије.

На основу груписања описаних дитерпен синтаза на филогенетском стаблу, може се претпоставити да су ти ензими настали дупликацијом предачког *CPS* гена, највероватније укљученог у примарни метаболизам, тј. синтезу гиберелина. Судећи по структури филогенетског стабла, највероватније је да су CPS ензими секундарног метаболизма еволуирали након раздвајања голосеменица и скривеносеменица. Такође је значајно да SfCPS припада групи монофункционалних дитерпен синтаза, заједно са још неколико ензима голосеменица и скривеносеменица (Gao и сар., 2009; Keeling и сар., 2010; Caniard и сар., 2012; Sallaud и сар., 2012; Hall и сар., 2013), и једним ензимом из ликофите *Selaginella moellendorffii* (G. Li и сар., 2012).

5.2. SfKSL као синтаза милтирадиена

CDP интермедијер настао активношћу дитерпен синтаза класе II, даље се конвертује у дитерпенске олефине циклизацијом катализованом дитерпен синтазама класе I, које су специфичне за *CDP* одређене стереохемије. Ови ензими обележавају се најчешће као KSL (eng. *kaurene synthase-like*), јер се претпоставља да су еволуирали од предачког ензима, каурен синтазе (KS), који је неопходан за синтезу биљних хормона гиберелина. У цДНК библиотеци жлезданих длака грчке жалфије (Chatzopoulou и сар., 2010) пронађена је секвенца која је означена као потенцијални кандидат дитерпен синтазе класе I, а због поседовања конзервираног мотива *DDxxD* у транслираној амино-киселинској секвенци, и због високе хомологије се осталим, до сад описаним, каурен синтазама. Овом гену кандидату додељен је назив *SfKSL*. Испитана је способност SfKSL ензима да као супстрат користи *CDP* настао активношћу ензима SfCPS и да га претвара у трициклични олефин. За синтезу карнозинске киселине био би значајан само ензим који је специфичан за *normal*-конформацију копалил дифосфата, јер би се супротном случају било јасно да се ради о ензиму укљученом у биосинтетски пут гиберелина.

Испрва, функционалност изолованог гена *SfKSL* испитана је на сличан начин као и у случају гена *SfCPS*, ензимским есејима у којима је коришћен

ензим експримиран у *E. coli*, и на тај начин је установљена његова активност и способност да конвертује *CDP* у ново једињење. Масени спектар тог једињења показао је високу сличност са недавно окарактерисаним милтирадиеном (Gao и сар., 2009). Будући да се многа једињења абиетанског типа одликују међусобно сличним масеним спектрима, веома је тешко само на основу *GC-MS* анализе са сигурношћу судити о њиховој тачној структури. Из тог разлога, одлучено је да се обави и анализа уз помоћ *NMR* спектроскопије, како би се прецизно испитала природа синтетисаног једињења. Ова спектроскопска метода може пружити изузетно корисне структурне информације, али је за њену примену неопходно обезбедити релативно високу количину испитиваног једињења. Из тог разлога, синтеза производа заједничке реакције ензима SfCPS и SfKSL обављена је коришћењем система за експресију у квасцима. Како би се испитала функционалност читавог система, изведени су есеји мањег обима, а синтеза производа реакције је испитана *SPME* анализом. Оба гена за дитерпен синтазе (*SfCPS* и *SfKSL*) истовремено су уведена у ћелије квасца, које су уз то, унутар свог хромозома носиле и ген за *GGDP* синтазу врсте Cistus creticus (*CcGGDPS*), чиме је обезбеђен и полазни прекурсор (Pateraki и Kanellis, 2008). Након потврде синтезе једињења налик милтирадиену у квасцима, прешло се на есеје већег обима, при чему су течне културе након инкубације екстраховане хексаном. Након тога, хексански екстракт је пречишћен на силика колони. Овај процес резултирао је обезбеђивањем довољне количине новог једињења чију је структуру било потребно испитати. *NMR* анализом установљено је да једињење синтетисано заједничком активношћу ензима SfCPS и SfKSL, поседује исте структурне карактеристике као милтирадиен. На тај начин, ензим SfKSL, дефинитивно је функционално окарактерисан као синтаза милтирадиена. Испитивање активности овог ензима додатно је обављено коришћењем есеја привремене експресије у врсти *Nicotiana benthamiana*. Показано је да је и овај метод испитивања функције ензима такође ефикасан, јер је резултирао синтезом милтирадиена у значајној количини. Будући да милтирадиен одликује *normal*-конформација, може се посредно закључити и да се прекурсор овог једињења, *CDP*, такође одликује истом

стереохемијом. Све ово указује на то да су SfCPS и SfKSL, ензими грчке жафије, хомологи ензимима SmCPS и SmKSL кинеске жалфије, јер и једни и други доводе до синтезе милтирадиена (Gao и сар., 2009).

GC-MS анализа производа реакција катализованих ензимима SfCPS и SfKSL, како у квасцу, тако и у листовима *N. benthamiana*, указала је на постојање пика за још једно једињење, чији је масени спектар показивао највећу сличност са дитерпеном абиетатриеном. На који начин ово једињење настаје није сигурно. Једна могућност је спонтана ароматизација оксидацијом милтирадиена у присуству кисеоника, а такође није искључена ни улога ензимске активности неког до сад неидентификованог ендогеног биљног протеина. Анализа *GC-MS* хроматограма хексанског екстракта из *in vitro* ензимског есеја са пречишћеним SfKSL протеином експримираним у бактерији *E. coli*, није резултирала идентификацијом пика за абиетатриен. Међутим, узевши у обзир чињеницу да је интензитет пика милтирадиена на *GC-MS* хроматограму био веома низак, постоји могућност да је абиетатриен био присутан у екстракту, међутим, његова количина је била испод границе детекције *GC-MS* технике.

Анализа амино-киселинске секвенце ензима SfKSL, указала је да се овај монофункционални протеин, због недостатка унутрашњег γ-домена, одликује дводоменском структуром. Већина биљних дитерпен синтаза одликује се, са друге стране, $\alpha\beta\gamma$-тридоменском структуром. Слични са SfKSL, по недостатку γ-домена, јесу и већ поменути ензим SmKSL кинеске жалфије и склареол синтаза врсте *Salvia sclarea* (SsSS) (Hillwig и сар., 2011; Caniard и сар., 2012). У случају сва три ензима, хомологија са осталим KSL секвенцама почиње тек након унутрашњег γ-домена, што указује на то да се ови протеини састоје само од α и β домена, слично као и код моно- и сесквитерпен синтаза. Претпоставка је да се губитак γ-домена вероватно догодио код заједничког претка дводоменских ензима, од којег су еволуирали прекурсори моно- и сесквитерпен синтаза (Hillwig и сар., 2011). Док је γ-домен неопходан за каталитичку активност карактеристичну за ензиме класе II, активно место монофункционалних дитерпен синтаза налази се на α-домену. Филогенетске анализе указале су на груписање

дитерпен синтаза класе I породице *Lamiaceae* у једну грану и њихово одвајање од дитерпен синтаза секундарног метаболизма припадника породице *Solanaceae*, који такође чине засебну грану на филогенетском стаблу. Ови ензими, *cis*-абиенол синтаза дувана (NtABS), феландрен синтаза парадајза (SlPHS) и сантален/бергамотен синтаза дивљег парадајза (ShSBS), иако веома блиски са ензимима SfKSL, SsSS и SmKSL, разликују се од њих управо по поседовању *γ*-домена у својој структури (Leonhardt и сар., 2009; Schilmiller и сар., 2009; Sallaud и сар., 2012). Све то указује на могућност да је описано губљење *γ*-домена релативно нов догађај у еволуцији дитерпен синтаза и да се догодило након раздвајања породица *Solanaceae* и *Lamiaceae*. Међутим, постоје индиције да се сличан губитак догодио и раније у еволуцији терпен синтаза, јер је недостатак овог домена недавно уочен и код пшенице, која припада монокотилама (Hillwig и сар., 2011). Претпоставка је да су се ови догађаји десили независно један од другог, а постоје индиције да је оваквих губитака ензимских домена било и више током еволуције биљака.

5.3. Идентификација нових гена кандидата уз помоћ 454 секвенционирања

Активношћу дитерпен синтаза SfCPS и SfKSL и синтезом милтирадиена завршава се формирање основног трицикличног карбонилног скелета. За даљу синтезу карнозинске киселине из милтирадиена неопходне су комплексне реакције измене структуре. Како би се разумеле молекулске основе механизама ових трансформација, приступљено је покушају идентификације гена од значаја, како грчке жалфије, тако и рузмарина.

5.3.1. Биљни материјал

Функционално-геномички приступ изолацији гена заснован на секвенционирању нове генерације до сад се показао као веома успешан у случају дитерпен синтаза. Посебно значајно за овај рад било је недавно обављено „класично“ *EST* секвенционирање транскриптома жлезданих длака грчке жалфије (Chatzopoulou и сар., 2010), на основу којег су

успешно изоловани и окарактерисани гени *SfCPS* и *SfKSL* (поглавље 4.1.). Међутим, коначан број прочитаних секвенци наведеним секвенционирањем, као и њихова просечна дужина били су релативно ниски, што је указало на слабу покривеност анализираног транскиптома. Гени од интереса за ову дисертацију, као и већина гена секундарног метаболизма, одликују се релативно ниским нивоом експресије у ткивима биљке. Како би се повећала вероватноћа проналажења свих гена који су одговорни за биосинтезу карнозинске киселине, одлучено је да се понови секвенционирање транскриптома грчке жалфије, уз коришћење напреднијих техника секвенционирања. Нове методе секвенционирања генома и транскриптома развијају се великом брзином, омогућавајући све дубљу анализу геномских основа функционисања биљака. Секвенционирање нове генерације обезбеђује све већи број „прочитаних" секвенци, чије дужине су све веће, а време неопходно за читање сваког узорка постаје значајно краће (Liu и сар., 2012). Из тог разлога, обављено је секвенцирање транскриптома жлезданих длака грчке жалфије помоћу *454 GS FLX Titanium* платформе (пиросеквенцирање), како би се обезбедила основа за следеће кораке изолације и функционалне карактеризације гена кандидата. Испитивање биосинтетског пута карнозинске киселине проширено је анализом транскриптома рузмарина, још једне врсте коју одликује изузетно висок садржај фенолних дитерпена. Ова медитеранска врста филогенетски је блиска са жалфијом, па је претпостављено и да је сличност гена биосинтетског пута карнозинске киселине висока.

Како су гени *SfCPS* и *SfKSL* успешно идентификовани на основу *EST* анализе транскриптома жлезданих длака грчке жалфије, одлучено је да се ове секреторне структуре користе као почетни материјал и за проналажење гена кандидата за следеће кораке биосинтетског пута. У прилог избору жлезданих длака за анализу секвенционирањем ишли су и резултати *LC-MS* анализе. Ова анализа имала је за циљ идентификацију материјала са највишим садржајем карнозинске киселине, тј. утврђивање услова гајења биљака, стадијума њиховог развића и најпогоднијег ткива за секвенционирање и проналажење гена кандидата за синтезу овог

фенолног дитерпена. Анализа хемијског садржаја *LC-PDA-LTQ-Orbitrap FTMS* методом идентификовала је жлездане длаке младих листова грчке жалфије генотипа „Кавуси“ као најбогатији извор карнозинске киселине. У случају рузмарина, материјал који је коришћен за секвенционирање биле су жлездане длаке млађих стадијума развоја комерцијалног генотипа (*B & T World Seeds*).

Виша концентрација фенолних дитерпена детектована у генотипу „Кавуси“ грчке жалфије, у односу на генотип „Врисес“, у складу је са резултатима ранијих истраживања, која су показала да је садржај етеричног уља биљака грчке жалфије које расту на свом природном станишту, острву Крит, веома варијабилан (Karousou и Kokkini, 1997). Село Кавуси налази се на источном делу острва Крит, које се у односу на село Врисес (западни део острва), одликује вишим средњим годишњим температурама, вишом осунчаношћу, и нижом количином падавина. *RAPD* анализа клонова грчке жалфије показала је да је ова варијабилност у хемијском саставу биљака генетске природе, и да највероватније претставља адаптацију на варијабилне услове спољашње средине (Melpomeni Skoula и сар., 1999). Генетска основа диверзитета хемијских профила након тога додатно је потврђена гајењем биљака грчке жалфије пореклом са различитих делова острва Крит (M Skoula и сар., 2000). Клонови, за које су раније биле утврђене разлике у саставу етеричног уља и у садржају укупних фенолних једињења, задржали су те разлике и током раста у контролисаним условима (стакленик и огледно поље) (M Skoula и сар., 2000). Утицај генетских фактора на садржај карнозинске киселине запажен је и код рузмарина (Hidalgo и сар., 1998). Све ово наводи на закључак да су разлике у садржају фенолних дитерпена између различитих генотипова, утврђене у овој дисертацији, највероватније генетске природе и представљају адаптације на услове животне средине области са којих су различити генотипови потекли.

Производња фенолних дитерпена код испитиваних врста различито је регулисана током развића биљака, тако да су се млади листови одликовали већим садржајем ових једињења у односу на старије листове. Ова појава

примећена је и раније код рузмарина и жалфије (*S. officinalis*) (Hidalgo и сар., 1998; Tounekti и сар., 2012). Такође, повећан садржај лабданских дитерпена у младим листовима забележен је и код још једне медитеранске врсте — *Cistus creticus* (Falara и сар., 2008). Висока концентрација фенолних дитерпена са антиоксидативном улогом у младим, осетљивим ткивима, указује на значај ових једињења за савладавање различитих стресогених фактора спољашње средине.

Примена благе суше и интензивног осветљења индуковала је повећану синтезу карнозинске киселине у листовима грчке жалфије, па је и тај третман примењен на биљкама пре прикупљања материјала за анализу транскриптома секвенционирањем. Утицај суше на садржај фенолних дитерпена и сезонска варирања у садржају истих детаљно су испитивани код врста породице *Lamiaceae* (Hidalgo и сар., 1998; Munné-Bosch и сар., 1999; Munné-Bosch и Alegre, 2000; Nogués и Baker, 2000; del Baño и сар., 2003; Luis и Johnson, 2005; Maria J. Jordán и сар., 2013). Ова испитивања дала су мешовите резултате. У већини истраживања забележено је смањење садржаја фенолних дитерпена у биљкама изложеним утицају суше и интензивног осветљења током летњег периода, јер је долазило до конверзије ових једињења у високо оксидоване абиетане (González и сар., 1992; J. G. Luis и сар., 1994). Међутим, Луис (*Luis)* и сарадници (2007) уочили су повећање концентрације фенолних дитерпена изазвано *UV-B* светлошћу, код рузмарина, а Хидалго (*Hidalgo)a* и сарадници (1998), запазили су поступно повећање садржаја карнозинске киселине током пролећа и лета. Овакви неусаглашени резултати досадашњих студија указују на неопходност додатних испитивања, како би се у потпуности расветлио тачан механизам одговора биљака на дејство стресогених фактора.

Компаративна хемијска анализа садржаја фенолних једињења идентификовала је жлездане длаке као ткиво у којем се врши биосинтеза карнозинске киселине. Са друге стране, карнозол, резултат дехидрогенације карнозинске киселине, заступљенији је у листовима са уклоњеним жлезданим длакама. Оваква дистрибуција два сродна фенолна

једињења може се објаснити на два начина. Једна претпоставка јесте да се конверзија карнозинске киселине у карнозол одвија унутар жлезданих длака, и да се настало једињење транспортује након тога у листове. Друга могућност јесте транспорт карнозинске киселине у листове, након чега долази до синтезе карнозола. До одговара на ово питање неопходна су додатна испитивања.

Наведене анализе указују на значај пажљивог одабира ткива, одговарајућег ступња развића и услова гајења, за резултате функционалне геномике, посебно дубинског секвенционирања транскриптома, у циљу изолације и карактеризације гена који учествују у синтези карнозинске киселине.

5.3.2. Анализа транскриптома и одабир гена кандидата

Као што је претпостављено, 454 секвенционирање пружило је велику количину нових информација о генима транскрибованим у жлезданим длакама грчке жалфије и рузмарина. Укупан број секвенци асемблираних након претходне *EST* анализе грчке жалфије био је 904 (Chatzopoulou и сар., 2010). Тај број се, након пиросеквенционирања, попео на 29912. У случају рузмарина, број секвенци био је још већи, и износио је 57254. Све секвенце дуже од 200 базних парова упоређене су са *NCBI* базом података за секвенце пептида *blasx* алгоритмом. За 78% асемблираних секвенци грчке жалфије пронађени су хомолози, а проценат идентификованих секвенци рузмарина износио је 85. Асемблиране секвенце које нису одговарале ни једном протеину из базе података, највероватније припадају метаболизму специфичном за трихоме. Проценат неанотираних секвенци сличан је са процентом истих код других биљних врста, где је варирао у опсегу од 22% до 35% (Lange и сар., 2000; D R Gang и сар., 2001; Chatzopoulou и сар., 2010). Утврђивањем *GO* (*Gene ontology*) термина установљено је да процеси секундарног метаболизма карактеришу 0,75% анотираних секвенци грчке жалфије, а најзаступљенији биолошки процеси били су ћелијски процеси (23%) и метаболички процеси (21%). У секундарни метаболизам код рузмарина убројано је 0,55% секвенци, а

најзаступљенији биолошки процеси, као и код грчке жалфије, били су ћелијски процеси (22%) и метаболички процеси (21%). Најзаступљеније молекуларне функције биле су везивање (42% и 44%) и каталитичка активност (40% и 38%). Проценат секвенци везаних за секундарни метаболизам у односу на остале метаболичке процесе био је релативно низак. Међутим, неопходно је узети у обзир чињеницу да за 30 % секвенци грчке жалфије и 22 % секвенци рузмарина нису утврђени *GO* термини. Највероватније је да се управо у овој групи налазе гени специјализованог метаболизма, који су за сада још недовољно познати и чије секвенце не постоје у релевантним базама података.

Иако је процентуална заступљеност гена секундарног метаболизма међу асемблираним секвенцама била релативно ниска, велики број метаболичких *KEGG* путева повезаних са секундарних метаболизмом је идентификовано (29 метаболичких путева код грчке жалфије и 33 код рузмарина). Међу секвенцама рузмарина, налазе се сви гени који кодирају за ензиме како *MVA*, тако и *MEP* биосинтетског пута. Међу секвенцама грчке жалфије, једини гени који недостају јесу дифосфомевалонат декарбоксилаза (*MVA* пут) и 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-*C*-метил-*D*-еритритол киназа (*CMK*, *MEP* пут). Од пренилтрансфераза, код рузмарина су идентификоване геранил дифосфат синтаза и геранилгеранил дифосфат синтаза, а код грчке жалфије геранил дифосфат синтаза. Значајан број гена даљих путева синтезе терпена такође је изолован. За монотерпен синтазе и дитерпен синтазе код грчке жалфије било је присутно по 15 гена кандидата, а за сесквитерпен синтазе 4 гена. Код рузмарина, идентификовано је 15 потенцијалних гена за монотерпен синтазе, 8 за дитерпен синтазе и 3 за сесквитерпен синтазе. Такође, укупно 250 асемблираних секвенци одликовала је сличност са генима који кодирају за цитохром *P450* ензиме, за које је позната повезаност са биосинтезом различитих терпена. Све горе поменуте секвенце указују на локализацију биосинтетских путева мноштва различитих секундарних метаболита у жлезданим длакама испитаних представника породице *Lamiaceae*.

Иако се са сигурношћу не може проценити покривеност транскриптома описаним 454 секвенционирањем, будући да комплетне геномске секвенце грчке жалфије и рузмарина нису до сада познате, јасно је да је ова анализа дала значајне нове податке у вези генске експресије жлезданих длака испитаних врста. На тај начин направљена је основа не само за изолацију гена биосинтетског пута карнозинске киселине, већ и за будући рад на расветљавању генетске позадине различитих биолошких процеса.

5.3.3. Карактеризација гена и идентификација феругинол синтаза

5.3.3.1. Синтеза милтирадиена активношћу дитерпен синтаза рузмарина у квасцима

Међу асемблираним секвенцама, пронађене су секвенце која одговарају изолованим генима *SfCPS* и *SfKSL* (контизи *Sfru.N01.C012304* и *Sfru.N01.C007690*), а присутне су и сродне секвенце *Sfru.N01.C10038* и *roffu.N01.C10039*, које највероватније кодирају ензиме биосинтетског пута гиберелина. Такође, и међу асемблираним секвенцама рузмарина, идентификоване су секвенце хомологе са изолованим генима жалфије (*Roff.N01.C023303 — RoCPS*, *Roff.N01.C024308 — RoKSL1* и *Roff.N01.C014868 — RoKSL2*). Изолација ових дитерпен синтаза и њихова карактеризација есејима привремене експресије у дувану обављена је у лабораторији др Алана Тисијеа. Анализе функције изолованих гена рузмарина показале су да је резултат активности ензима које они кодирају, исти као и код хомологих гена грчке жалфије, тј. синтеза милтирадиена. Ови резултати потврђени су и експериментима експресије у квасцима, описаним у овом раду, а гени рузмарина који синтетишу милтирадиен коришћени су као основа за развијање система чији је циљ био карактеризација следећег ензима у биосинтетском путу карнозинске киселине.

5.3.3.2. Цитохром *P450* кандидати и карактеризација феругинол синтаза грчке жалфије и рузмарина

Неопходне реакције од милтирадиена до карнозинске киселине укључују ароматизацију С-прстена, праћену хидроксилацијама на позицијама *C-11* и *C-12*, и оксидацијом метил групе на позицији *C-20* до карбоксилне киселине. Многе од наведених биолошких трансформација катализују цитохром *P450* ензими. Селекција гена кандидата припадника ове групе изузетно је захтеван процес, пре свега због високе специфичности цитохрома *P450* за супстрате. Такође, и хомологија између секвенци *P450* протеина које обављају сличне или исте функције код различитих врста, на нижем је нивоу него код других класа ензима. Након пажљиве и детаљне анализе цитохром *P450* ензимских секвенци из транскриптома грчке жалфије и рузмарина, извршен је одабир кандидата за даље реакције биосинтетског пута. Првобитно, десет цитохром *P450* кандидата одабрано је за грчку жалфију, док је за рузмарин одабрано седам највероватнијих кандидата. Од тих 17 секвенци, седам гена припадало је *CYP71* фамилији (*CYP71AxSf3*, *CYP71AxSf1*, *CYP71AySf1*, *CYP71DSf2*, *CYP71ASf1*, *CYP71AxR01* и *CYP71AyR01*), 5 је припадало *CYP72* фамилији (*CYP72AxSf1*, *CYP72xSf1*, *CYP72AxR04*, *CYP72AxR02* и *CYP72xR01*), и четири *CYP96* фамилији гена (*CYP96xSf2*, *CYP96xSf1*, *CYP96xR01* и *CYP96xR02*). Накнадно је за изолацију и испитивање функције одабрано још три гена (*CYP76Sf2*, *CYP76R03* и *CYP76R04*), као представника *CYP76* фамилије. Такође, приликом покушаја изолације, осим секвенци гена кандидата, неспецифично су умножене и секвенце назване *CYP71AxSf4*, *CYP96xSf3*, *CYP71DSf3* и *CYP71ASf4*. Све наведене фамилије цитохрома *P450* изабране су због чињенице да у другим биљним врстама припадници ових фамилија учествују у метаболизму секундарних метаболита, а неки од њих, специфично, катализују реакцију хидроксилације супстрата. *CYP71* највећа је фамилија цитохром *P450* ензима у свим биљним врстама, и припада клану који носи исти назив. Први клонирани ген за цитохром *P450* протеин, за који је показано да га одликује активност хидроксилазе монотерпена, припада управо овој

фамилији гена, и изолован је из авокада (Bozak и сар., 1992). Од 54 припадника породице *CYP71* код врсте *Arabidopsis thaliana,* испитане су функције само гена *CYP71A12*, *CYP71A13* и *CYP71B15*. Показало се да CYP71A13 катализује конверзију индол-3-ацеталдоксима у индол-3-ацетонитрил у биосинтетском путу фитоалексина по називу камалексин (Nafisi и сар., 2007). Такође, припадници фамилије *CYP71D* катализују хидроксилацију лимонена код питоме нане (Haudenschild и сар., 2000), и 6-хидроксилацију флавона код соје (Latunde-Dada и сар., 2001). *CYP76* фамилија гена такође је део клана *CYP71*. За неколико припадника ове фамилије показало се да имају улогу у биосинтези терпена, прецизније у оксидацији монотерпена и дитерпена (Collu и сар., 2001; Swaminathan и сар., 2009; Sung и сар., 2011; Q. Wang и сар., 2012). Клан *CYP72*, којем припада фамилија *CYP72*, повезана је са метаболизмом великог броја углавном хидрофобних једињења у која спадају масне киселине и терпени, затим са катаболизмом хормона (бразиностероиди, гиберелин) и са биосинтезом цитокинина (Nelson и Werck-Reichhart, 2011). Секологанин синтаза врсте *Catharanthus roseus* (*CYP72A1*) укључена је у биосинтетски пут индолних алкалоида (Irmler и сар., 2000). Код врсте *Glycyrrhiza glabra,* CYP72A154 катализује синтезу глициретинске киселине хидроксилацијама 11-оксо-*b*-амирина и синтезу 30-хидрокси-бамарина хидроксилацијом *b*-амирина (Seki и сар., 2008). Такође, код врсте *Medicago truncatula,* CYP72A63 катализује синтезу 30-хидрокси-бамарина и 11-дезоксиглициретичне киселине хидроксилацијом *b*-амирина (Seki и сар., 2008). Фамилија *CYP96* припада клану *CYP86*, и по досадашњим истраживања, јединствена је за скривеносеменице. Код *Arabidopsis thaliana,* идентификовано је 15 претставника ове фамилије цитохрома *P450*, од којих је само ензим CYP96A15 функционално окарактерисан (Greer и сар., 2007). У питању је алкална оксидаза средишњег дела ланца, неопходна за биосинтезу површинског воска.

За анализу функције одабраних гена кандидата, изабрана је метода експресије у квасцима. Ова метода омогућава трансформације ћелија са више конструката истовремено, а такође омогућава и конструисање сојева

са измењеним нивоом синтезе супстрата неопходних за испитиване ензиме. Као директан прекурсор за цитохроме *P450* чија активност је понаособ испитивана, био је неопходан милтирадиен, чија је синтеза унутар ћелија квасца обезбеђена трансформацијом конструктима који су носили гене *SfCPS* и *SfKSL*, а основни супстрат *GGDP* обезбеђен је хромозомском интеграцијом гена *GGDPS* врсте *Cistus creticus*. Такође, на трећем вектору који је уведен у ћелије, налазио се и ген за *NADPH*: цитохром *P450* редуктазу (*SfCPR* или *PtCPR2*). На тај начин, конструисани су сојеви који су обезбеђивали како супстрате за све ензиме у низу, тако и трансфер електрона са кофактора *NADPH* уз помоћ *CPR* ензима. Хексански екстракти течних култура квасца анализирани су *GC-MS* методом. Укупно је испитано 24 цитохром *P450* гена кандидата (15 из грчке жалфије, и девет из рузмарина).

Овако постављени есеји функционалне карактеризације резултирали су идентификацијом ензима CYP76Sf2 грчке жалфије, и два ензима рузмарина, CYP76R03 и CYP76R04, за које се показало да имају функцију синтезе феругинола. Два CYP76 ензима рузмарина, због исте функције које обављају, представљају две различите изоформе, и сличност у њиховом амино-киселинском саставу износи 94,5%. Непосредно након добијања наведених резултата, Гуо са сарадницима (2013), известио је о изоловању и карактеризацији ензима CYP76AH1 кинеске жалфије, за који се показало да има исту функцију, тј. резилтат његове активности јесте такође синтеза феругинола. У почетку, претпоставка је била да CYP76AH1 обавља како ароматизацију милтирадиена тако и хидроксилацију *C-12* атома новонасталог једињења. Међутим, убрзо након тога, објављени су резултати изолације феругинол синтазе и из рузмарина (Zi и Peters, 2013), која је названа CYP76AH4. То истраживање је, између осталог, имало за циљ и да установи тачан редослед реакција од милтирадиена до феругинола. Показало се да абиетатриен, једињење које се и у есејима описаним у овој дисертацији јавља увек заједно са милтирадиеном, настаје спонтаном оксидацијом, и као такво претставља супстрат за CYP76 ензиме. Ови ензими затим врше хидроксилацију на *C-12* атому, чиме настаје

феругинол. Иако се описана оксидација дешава спонтано, није искључена ни могућност да *in planta* долази до ензимски катализоване ароматизације феругинола (Zi и Peters, 2013).

Публиковани цитохром *P450* ензим рузмарина, CYP76AH4 (Guo и сар., 2013), представља изоензим цитохром *P450* протеина рузмарина, чија је карактеризација описана у овој дисертацији. Сличност између ензима CYP76AH4 у саставу амино киселина износила је 85,1% са CYP76R03 и 83,3% са CYP76R04. CYP76AH1 кинеске жалфије, због истоветне функције коју обавља, може се сматрати ортологом све три феругинол синтазе рузмарина. Улога у биосинтези терпена доказана је до сада и у случају неколико CYP76 ензима других биљних врста. Ово се односи пре свега на цитохроме *P450* пиринча, који имају улогу у биосинтези дитерпена. Хидроксилацију *C-11* атома *ent*-касадиена, која је веома слична реакцији коју катализују ензими CYP76Sf2, CYP76R03 и CYP76R04, код пиринча врше ензими CYP76M7 и CYP76M8 (Swaminathan и сар., 2009; Q. Wang и сар., 2012). Такође, сличну реакцију обављају и ензими CYP76B6 (*Catharanthus roseus*) и CYP76B10 (*Swertia mussotii*), који катализују хидроксилацију *C-8* атома гераниола (Collu и сар., 2001; J. Wang и сар., 2010; Sung и сар., 2011).

Након успешно обављених есеја експресије у квасцима и детекције феругинола као следећег једињења биосинтетског пута карнозинске киселине, обављени су и покушаји функционалне карактеризације феругинол синтаза есејима привремене експресије у дувану. Почетни експеримент, којим је испитана активност ензима SfFS, није резултирао детекцијом пика за феругинол. За ефикасно функционисање цитохром *P450* ензима од велике важности је присуство *NADPH*: цитохром *P450* редуктаза, чија ефикасност у вршењу реакција редукције може значајно да варира, и често зависи од самог ензима на који преносе редукујући еквивалент. Из тог разлога, претпостављено је да ендогена *NADPH*: цитохром *P450* редуктаза врсте *N. benthamiana* не омогућава довољну ефикасност ензима SfFS, па је у следећем експерименту коришћена редуктаза врсте *Arabidopsis thaliana* (AtCPR1). Овај флавопротеин већ се

показао као погодан за правилно функционисање неколико цитохром *P450* ензима везаних за биосинтезу терпена, а посебно је значајно његово успешно коришћење у есејима карактеризације феругинол синтаза CYP76AH1 и CYP76AH4 (Guo и сар., 2013; Zi и Peters, 2013). Такође, у циљу супресије биљног „gene silencing" одговора, коришћен је и протеин p19. Резултат на описан начин поновљених есеја, у случају ензима SfFS, био је идентичан. Међутим, за ензим RoFS2, уочена је активност и пик феругинола, веома мале површине, детектован је на хроматограму. Овакви резултати указују на неопходност додатних експеримената оптимизације услова прелазних есеја, и проналажење узрока ниске ефикасности феругинол синтаза у *in planta* систему. Једна од могућности јесте коришћење другачијег соја бактерије *A. tumefaciens*, а такође и продужење времена инкубације биљака након инфилтрације.

5.3.3.3. Активност ензима CYP71 фамилије

Функција гена *CYP71AyR01, CYP71AySf1, CYP71AxR01, CYP71AxSf1* и *CYP71AxSf3* испитана је есејима привремене експресије, уз помоћ методе обједињеног прелиминарног тестирања, тј. инокулацијом листова *N. benthamiana* са свим наведеним кандидатима гена истовремено. Листови врсте *N. benthamiana* инокулирани су и генима *SfCPS, SfKSL* и *SfFS*, у циљу производње супстрата за реакцију катализовану цитохром *P450* ензимима. Предност оваквог приступа јесте могућност истовремене провере активности веће групе гена у једном експерименту. Само у случају позитивног резултата, тј. детекције синтезе једног или више нових једињења, приступа се детаљнијој анализи сваког гена понаособ, и утврђивање порекла новог производа реакције.

Анализа *GC-MS* хроматограма пре свега је указала на то да није дошло до синтезе феругинола. Иако ово једињење није било присутно у трансформисаним листовима дувана, два нова пика су уочена на гасном хроматограму. Из тога произилази да су једињења која одговарају овим пиковима синтетисана коришћењем милтирадиена или абиетатриена као супстрата. Пик са краћим ретенционим временом поседује молекулску

масу од 286 *Da*, исту као и феругинол. Ово наводи на закључак да је и ово, непознато једињење, настало хидроксилацијом абиетатриена, са том разликом што се оксидација није одиграла на *C-12* угљенику. Тачно место оксидације није било могуће утврдити само на основу масеног спектра. Судећи по молекулској маси једињења (288 *Da*), други пик највероватније настаје хидроксилацијом директно милтирадиена, али и у овом случају није јасно који је од угљеника био подвргнут оксидацији.

Како би се утврдио тачан механизам настанка детектованих једињења, неопходна је анализа активности сваког од гена појединачно. Синтетисана хидроксилована једињења могу бити резултат активности два различита ензима, али постоји могућност да обе реакције катализује само један од цитохром *P450* протеина. Познато је да ови ензими често нису специфични само за један супстрат, већ могу да врше оксидацију више различитих једињења (Ro и сар., 2005; Wu и сар., 2013). Није сигурно ни то да је показана активност примарна ензиму који је катализује, или је његова основна *in planta* функција оксидација неког другог једињења. Због тога је, након што се тачно идентификује ензим или ензими који катализују синтезу уочених непознатих једињења, важно тестирати и њихову активност у присуству феругинола као супстрата. Такође, неопходно је извршити анализу преосталих изолованих гена кандидата, како у дувану, тако и у квасцима.

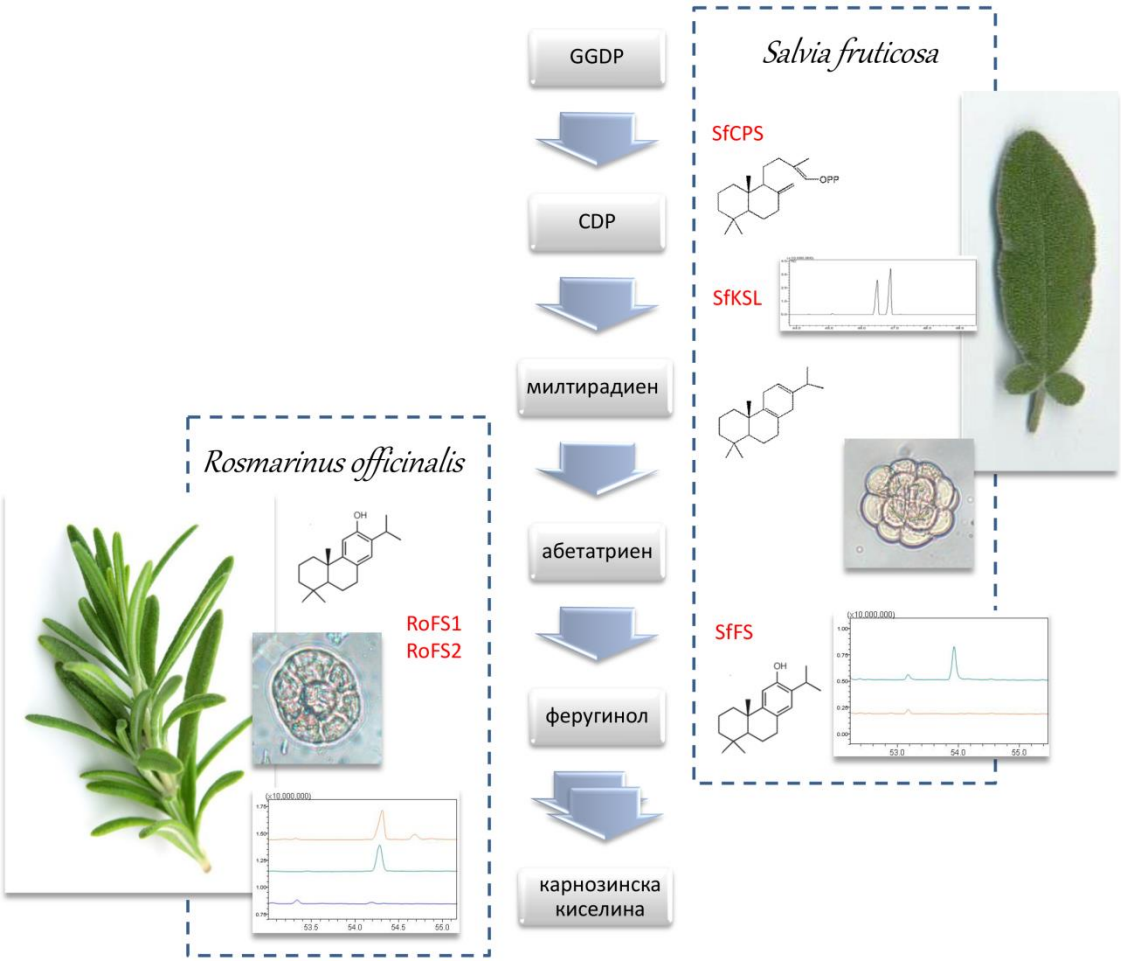
Последњи резултати испитивања ензимске функције указују на велику вероватноћу да се међу изолованим генима кандидатима грчке жалфије и рузмарина пронађу многи, ако не и сви, учесници процеса биосинтезе карнозинске киселине.

5.3.3.4. Допринос резултата докторске дисертације познавању биосинтетског пута карнозинске киселине

У овој дисертацији, експресијом у бактерији *E. coli*, квасацима и *in planta* есејима, показано је да три гена грчке жалфије, *SfCPS*, *SfKSL* и *SfFS*, кодирају ензиме који катализују синтезу феругинола из *GGDP*-а (Слика

38). Идентификовани су и гени рузмарина, *RoFS1* и *RoFS2*, задужени за синтезу истог дитерпена (Слика 38). Будући да је ферулинол прекурсор у синтези карнозинске киселине, ови резултати омогућавају будућа истраживања преосталих корака биосинтезе овог значајног биљног метаболита. Идентификација и изолација кључних ензима укључених у синтезу карнозинске киселине отклања битну препреку за примену биотехнолошких метода и омогућава генетски инжењеринг овог секундарног метаболита у природним домаћинима, другим биљним врстама, а такође и у микроорганизмима. Поред великог потенцијала за фармацеутску примену, карнозинска киселина, као природни антиоксиданс, може бити од велике користи као природни адитив у индустрији хране и козметичких средстава. У читавом свету све је израженији тренд замене вештачких адитива онима које долазе из природних извора, па би уз већ постојеће адитиве на бази екстракта рузмарина и жалфије, и пречишћена карнозинска киселина добијена различитим биотехнолошким процесима могла наћи широку комерцијалну примену.

Поред карнозинске киселине, сам ферулинол поседује многе биолошке активности, које су у великој мери сличне активностима које поседује карнозинска киселина (Muhammad и сар., 1992; Ono и сар., 1999; Iwamoto и сар., 2003; Rodríguez и сар., 2006). С обзиром на то да је присутан у екстрактима листова рузмарина и жалфије, велика је вероватноћа да део биолошких активности ових биљака долази управо од ферулинола. Из тог разлога, ензими окарактерисани у овој дисертацији могу и сами по себи бити од великог значаја, омогућавајући производњу ферулинола генетским инжењерингом за примену у фармацеутској индустрији.



Слика 38. Шематски приказ окарактерисаних корака биосинтетског пута карнозинске киселине грчке жалфије и рузмарина. Фотографије листа грчке жалфије преузета је са http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/Salv_off.html, а фотографија вршног дела изданка рузмарина преузета је са http://heallthytips.blogspot.com/2013/01/simple-spices-to-reduce-high-blood.html.

Транскрипција гена који учествују у биосинтези одређених метаболита обавља се под одређеним условима спољашње средине и у специфичним биљним ткивима. Из тог разлога, за идентификацију гена од интереса неопходно је познавање тачног места складиштења и синтезе секундарних метаболита. Ова дисертација идентификовала је жлездане длаке грчке жалфије и рузмарина, као ткиво у којем се одвија синтеза карнозинске киселине. У сврху локализације овог једињења, као и гена њеног биосинтетског пута, развијена је ефикасна метода изолације жлезданих длака, која је била праћена оптимизованом методом изолације РНК високог квалитета. Идентификација жлезданих структура одговорних за

производњу и складиштење карнозинске киселине, корисна је са економског становишта јер омогућава развијање метода за повећање приноса овог једињења. Не треба занемарити ни еколошки аспекат ових открића, што доприноси бољем разумевању биљних адаптација на услове спољашње средине и на њихову интеракцију са другим организмима.

Резултати испитивања молекуларних основа синтезе карнозинске киселине не доприносе само разумевању његовог метаболизма код грчке жалфије и рузмарина, већ и код свих других врста код којих је карнозинска киселина присутна. То представља веома значајан допринос широкој области која се бави изучавањем генетских и биохемијских основа секундарног метаболизма.

6

Закључци

- Синтеза и складиштење карнозинске киселине одвија се у жлезданим длакама грчке жалфије (*S. fruticosa*) и рузмарина (*R. officinalis*).

- Жлездане длаке млађих развојних ступњева садрже вишу концентрацију карнозинске киселине у односу на старије развојне ступњеве, а синтезу и акумулацију овог једињења индукују и блага суша и интензивно осветљење.

- Секвенционирање нове генерације, примењено на жлезданим длакама, ефикасан је метод за идентификацију и изолацију гена секундарног метаболизма код грчке жалфије и рузмарина, јер обезбеђује широку покривеност транскиптома овог високо специјализованог ткива.

- Након изолације и функционалне карактеризације гена *SfCPS* у *E. coli*, квасцима (*S. cerevisiae*) и дувану (*N. benthamiana*), утврђено је да ензим SfCPS грчке жалфије припада класи II дитерпен синтаза, који катализује синтезу копалил дифосфата из геранилгеранил дифосфата.

- Ензим SfKSL грчке жалфије припада класи I дитерпен синтаза и катализује синтезу милтирадиена из копалил дифосфата.

- Дитерпен синтазе, окарактерисане код грчке жалфије филогенетски су најсроднije дитерпен синтазама врста *Salvia miltiorrhiza* и *Salvia sclarea*.

- Цитохром *P450* монооксигеназа CYP76Sf2 грчке жалфије, и CYP76R03 и CYP76R04 рузмарина, катализују синтезу феругинола. Функција три гена који кодирају ове ензиме окарактерисана је хетерологом експресијом у квасцима и анализом њихове каталитичке активности. Идентификован је и изолован још 21 цитохром *P450* ензим грчке жалфије и рузмарина, чија је функционална карактеризација у току.

- Функционална карактеризација гена биосинтетског пута карнозинске киселине уз помоћ бактерије *E. coli*, ефикасна је метода за испитивање активности појединачних гена, док експресија у квасцима (*S.*

cerevisiae) и дувану (*N. benthamiana*) омогућава експресију више гена кандидата истовремено.

- На основу свих приложених резултата, може се извести закључак да су копалил дифосфат, милтирадиен, абиетатриен и феругинол вероватни прекурсори биосинтетског пута карнозинске киселине.

7
Литература

Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., и Arsenakis, M. (1998). Antifungal activities of Origanum vulgare subsp. hirtum, *Mentha spicata*, Lavandula angustifolia, and Salvia fruticosa essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 1739–1745.

Akhtar, T. a, Matsuba, Y., Schauvinhold, I., Yu, G., Lees, H. A, Klein, S. E., и Pichersky, E. (2013). The tomato cis-prenyltransferase gene family. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *73*, 640–52.

Al, S., Duletić-Laušević, S., Janošević, D., Budimir, S., Marin, M., Alimpić, A., Giweli, A. A. M., и Marin, P. D. (2013). Micromorphology and ultrastructure of trichomes of Libyan *Salvia fruticosa* Mill. *Archives of Biological Sciences*, *65*, 239–246.

Ali-Shtayeh, M., и Abu Ghdeib, S. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, *672*, 665–672.

Amin, A., и Hamza, A. A. (2005). Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life sciences*, *77*, 266–78.

An, G., Ebert, P. R., Mitra, A., и Ha, S. B. (1989). Binary vectors. In *Plant molecular biology manual* (pp. 29–47). Springer Netherlands.

Areche, C., Rodríguez, J. A., Razmilic, I., Yáñez, T., Theoduloz, C., и Schmeda-Hirschmann, G. (2007). Gastroprotective and cytotoxic effect of semisynthetic ferruginol derivatives. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, *59*, 289–300.

Areche, C., Schmeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., и Rodríguez, J. A.. (2009). Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphacele chamaedryoides* (Balbis) Briq. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, *61*, 1689–97.

Aruoma, O. I., Spencer, J. P., Rossi, R., Aeschbach, R., Khan, A., Mahmood, N., Munoz, A., Murcia, A., Butler, J., и Halliwell, B. (1996). An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *34*, 449–56.

Asawatreratanakul, K., Zhang, Y.-W., Wititsuwannakul, D., Wititsuwannakul, R., Takahashi, S., Rattanapittayaporn, A., и Koyama, T. (2003). Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis*. *European Journal of Biochemistry*, *270*, 4671–4680.

Ascensão, L., Mota, L., и Castro, M. (1999). Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany*, 437–447.

Balint, G. A. (2001). Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacology u therapeutics*, *90*, 261–5.

Banna, H., Soliman, M., и Wabel, N. (2013). Hepatoprotective Effects of *Thymus* and *Salvia* Essential oils on Paracetamol-Induced Toxicity in Rats. *Journal of Physiology and Pharmacology Advances*, *3*, 41.

Barton, D. H. R., и Cane, D. E. (1999). *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids (Vol. two)* (p. 484). Pergamon Pr.

Bauer, J., Kuehnl, S., Rollinger, J. M., Scherer, O., Northoff, H., Stuppner, H., Werz, O., и Koeberle, A. (2012). Carnosol and carnosic acids from *Salvia officinalis* inhibit microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *342*, 169–76.

Bayrak, A., и Akgül, A. (1987). Composition of essential oils from turkish *Salvia* species. *Phytochemistry*, *26*, 846–847.

Bertea, C. M., Schalk, M., Karp, F., Maffei, M., и Croteau, R. (2001). Demonstration that menthofuran synthase of mint (*Mentha*) is a cytochrome P450 monooxygenase: cloning, functional expression, and characterization of the responsible gene. *Archives of biochemistry and biophysics*, *390*, 279–86.

Besser, K., Harper, A., Welsby, N., Schauvinhold, I., Slocombe, S., Li, Y., Dixon, R. A., и Broun, P. (2009). Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. *Plant physiology*, *149*, 499–514.

Biswas, K. K., Foster, A. J., Aung, T., и Mahmoud, S. S. (2008). Essential oil production: relationship with abundance of glandular trichomes in aerial surface of plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, *31*, 13–19.

Blanc, V. V. M., и Pichersky, E. (1995). Nucleotide sequence of a *Clarkia breweri* cDNA clone of Ipi1, a gene encoding isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant physiology*, *108*, 855–6.

Bleeker, P. M., Spyropoulou, E. A., Diergaarde, P. J., Volpin, H., De Both, M. T. J., Zerbe, P., Bohlmann, J., Falara, V., Matsuba, Y., Pichersky, E., Haring, M. A., и Schuurink, R. C. (2011). RNA-seq discovery, functional characterization, and comparison of sesquiterpene synthases from *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites* trichomes. *Plant molecular biology*, *77*, 323–36.

Bohlmann, J., и Keeling, C. I. (2008). Terpenoid biomaterials. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *54*, 656–69.

Boix, Y. F., Victório, C. P., Defaveri, A. C. A., Arruda, R. D. C. D. O., Sato, A., и Lage, C. L. S. (2011). Glandular trichomes of *Rosmarinus officinalis* L.: Anatomical and phytochemical analyses of leaf volatiles. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, *145*, 848–856.

Bolwell, G. P., Bozak, K., и Zimmerlin, A. (1994). Plant cytochrome p450. *Phytochemistry*, *37*, 1491–1506.

Boussaada, O., Ammar, S., Saidana, D., Chriaa, J., Chraif, I., Daami, M., Helal, a N., и Mighri, Z. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. *Microbiological research*, *163*, 87–95.

Bouvier, F., D'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R. A., Camara, B., и Harlingue, A. (1998). Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits1. *Plant physiology*, *117*, 1423–31.

Bozak, K. R., O'Keefe, D. P., и Christoffersen, R. E. (1992). Expression of a Ripening-Related Avocado (*Persea americana*) Cytochrome P450 in Yeast. *Plant physiology*, *100*, 1976–81.

Bozak, K. R., Yu, H., Sirevag, R., и Christoffersen, R. E. (1990). Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*, 3904–3908.

Bräuchler, C., Meimberg, H., и Heubl, G. (2010). Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae)--Taxonomy, biogeography and conflicts. *Molecular phylogenetics and evolution*, *55*, 501–23.

Bruno, M., Savona, G., Piozzi, F., de la Torre, M. C., Rodriguez, B., и Marlier, M. (1991). Abietane diterpenoids from *Lepechinia meyeni* and *Lepechinia hastata*. *Phytochemistry*, *30*, 2339–2343.

Burke, C. C., Wildung, M. R., и Croteau, R. (1999). Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*, 13062–7.

Cambie, R. C., Cox, R. E., и Sidwell, D. (1984). Phenolic diterpenoids of podocarpus ferrugineus and other podocarps. *Phytochemistry*, *23*, 333–336.

Caniard, A., Zerbe, P., Legrand, S., Cohade, A., Valot, N., Magnard, J.-L., Bohlmann, J., и Legendre, L. (2012). Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture. *BMC plant biology*, *12*, 119.

Cankar, K., van Houwelingen, A., Bosch, D., Sonke, T., Bouwmeester, H., и Beekwilder, J. (2011). A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS letters*, *585*, 178–82.

Cao, R., Zhang, Y., Mann, F. M., Huang, C., Mukkamala, D., Hudock, M. P., Mead, M. E., Prisic, S., Wang, K., Lin, F., Chang, T., Peters, R. J., и Oldfield, E. (2010). Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold. *Proteins*, *78*, 2417–32.

Catsiotis, S., и Iconomou, N. G. (1984). Qualitative and quantitative comparative gas-liquid-chromatographic analysis of the essential oil of *Salvia triloba* grown in Greece. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, *59*, 29–32.

Celiktas, O., Bedir, E., и Sukan, F. (2007). In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, *101*, 1457–1464.

Chang, S. S., Ostrić-Matijašević, B., Hsieh, O. A. L., и Huang, C.-L. (1977). Natural antioxidats From Rosemary and Sage. *Journal of Food Science*, *42*, 1102–1106.

Chang, S. T., Chen, P. F., Wang, S. Y., и Wu, H. H. (2001). Antimite activity of essential oils and their constituents from *Taiwania cryptomerioides*. *Journal of medical entomology*, *38*, 455–7.

Chatzopoulou, F. M., Makris, A. M., Argiriou, A., Degenhardt, J., и Kanellis, A. K. (2010). EST analysis and annotation of transcripts derived from a trichome-specific cDNA library from *Salvia fruticosa*. *Plant cell reports*, *29*, 523–34.

Chen, F., Ro, D. K., Petri, J., Gershenzon, J., Bohlmann, J., Pichersky, E., и Tholl, D. (2004). Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1, 8-cineole. *Plant physiology*, *135*, 1956.

Chen, S., Glawischnig, E., Jørgensen, K., Naur, P., Jørgensen, B., Olsen, C.-E., Hansen, C. H., Rasmussen, H., Pickett, J. A., и Halkier, B. A. (2003). CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *33*, 923–37.

Chen, T.-W., Gan, R.-C. R., Wu, T. H., Huang, P.-J., Lee, C.-Y., Chen, Y.-Y. M., Chen, C.-C., и Tang, P. (2012). FastAnnotator--an efficient transcript annotation web tool. *BMC genomics*, *13 Suppl 7*, S9.

Christianson, D. W. (2006). Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chemical reviews*, *106*, 3412–42.

Clarkson, C., Musonda, C. C., Chibale, K., Campbell, W. E., и Smith, P. (2003). Synthesis of totarol amino alcohol derivatives and their antiplasmodial activity and cytotoxicity. *Bioorganic и Medicinal Chemistry*, *11*, 4417–4422.

Clastre, M., Bantignies, B., Feron, G., Soler, E., и Ambid, C. (1993). Purification and Characterization of Geranyl Diphosphate Synthase from *Vitis vinifera* L. cv Muscat de Frontignan Cell Cultures. *Plant physiology*, *102*, 205–211.

Collu, G., Unver, N., Peltenburg-Looman, a M., van der Heijden, R., Verpoorte, R., и Memelink, J. (2001). Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS letters*, *508*, 215–20.

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., и Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *21*, 3674–6.

Costa, M. do C. de C. D., и Nascimento, S. C. do. (2003). Atividade citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, *22*, 155–158.

Covello, P. S. (2008). Making artemisinin. *Phytochemistry*, *69*, 2881–5.

Covello, P. S., Teoh, K. H., Polichuk, D. R., Reed, D. W., и Nowak, G. (2007). Functional genomics and the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry*, *68*, 1864–71.

Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J., и Degenhardt, J. (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant molecular biology*, *73*, 587–603.

Croteau, R. (1991). Metabolism of monoterpenes in mint (mentha) species. *Planta medica*, *57*, S10–S14.

Croteau, R., Ketchum, R. E. B., Long, R. M., Kaspera, R., и Wildung, M. R. (2006). Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, *5*, 75–97.

Croteau, R., и Purkett, P. T. (1989). Geranyl pyrophosphate synthase: characterization of the enzyme and evidence that this chain-length specific prenyltransferase is associated with monoterpene biosynthesis in sage (*Salvia officinalis*). *Archives of biochemistry and biophysics*, *271*, 524–35.

Cui, H., Zhang, S.-T., Yang, H.-J., Ji, H., и Wang, X.-J. (2011). Gene expression profile analysis of tobacco leaf trichomes. *BMC plant biology*, *11*, 76.

Cui, L., Kim, M. O., Seo, J. H., Kim, I. S., Kim, N. Y., Lee, S. H., Park, J., Kim, J., и Lee, H. S. (2012). Abietane diterpenoids of *Rosmarinus officinalis* and their diacylglycerol acyltransferase-inhibitory activity. *Food Chemistry*, *132*, 1775–1780.

Cunillera, N., Arró, M., Forés, O., Manzano, D., и Ferrer, a. (2000). Characterization of dehydrodolichyl diphosphate synthase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme in dolichol biosynthesis. *FEBS letters*, *477*, 170–4.

Cuvelier, M.-E., Richard, H., и Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *73*, 645–652.

Daferera, D. J., Ziogas, B. N., и Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, *48*, 2576–81.

Dai, X., Wang, G., Yang, D. S., Tang, Y., Broun, P., Marks, M. D., Sumner, L. W., Dixon, R. A., и Zhao, P. X. (2010). TrichOME: a comparative omics database for plant trichomes. *Plant physiology*, *152*, 44–54.

Dai, Z., Liu, Y., Huang, L., и Zhang, X. (2012). Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, *109*, 2845–53.

Daly, R., и Hearn, M. T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition: JMR*, *18*, 119–38.

Davis, E. M., Ringer, K. L., McConkey, M. E., и Croteau, R. (2005). Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. *Plant physiology*, *137*, 873.

De Feo, V., и Senatore, F. (1993). Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan Coast, Salerno Province, Campania, Southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, *39*, 39–51.

De Kraker, J.-W., Schurink, M., Franssen, M. C. ., König, W. A., de Groot, A., и Bouwmeester, H. J. (2003). Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Tetrahedron*, *59*, 409–418.

De Luca, V., и Laflamme, P. (2001). The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, *4*, 225–233.

Degenhardt, J., Köllner, T. G., и Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, *70*, 1621–37.

Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., del Río, J. A., Ortuño, A., Quirin, K.-W., и Gerard, D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*, 4247–53.

Demetzos, C., Angelopoulou, D., и Perdetzoglou, D. (2002). A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, *30*, 651–665.

Demissie, Z. A., Sarker, L. S., и Mahmoud, S. S. (2011). Cloning and functional characterization of β-phellandrene synthase from *Lavandula angusti*folia. *Planta*, *233*, 685–96.

DiMiceli, L., Pool, V., Kelso, J. M., Shadomy, S. V, и Iskander, J. (2006). Vaccination of yeast sensitive individuals: review of safety data in the US vaccine adverse event reporting system (VAERS). *Vaccine*, *24*, 703–7.

Dogbo, O., и Camara, B. (1987). Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum*

chromoplasts by affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *920*, 140–148.

Du, L., Lykkesfeldt, J., Olsen, C. E., и Halkier, B. a. (1995). Involvement of cytochrome P450 in oxime production in glucosinolate biosynthesis as demonstrated by an in vitro microsomal enzyme system isolated from jasmonic acid-induced seedlings of *Sinapis alba* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*, 12505–9.

Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V. M., и Pichersky, E. (1996). Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *The Plant Cell*, *8*, 1137–1148.

Đilas, S., Knez, Ž., Četojević-Simin, D., Tumbas, V., Škerget, M., Čanadanović-Brunet, J., и Ćetković, G. (2012). In vitro antioxidant and antiproliferative activity of three rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract formulations. *International Journal of Food Science u Technology*, *47*, 2052–2062.

El-Feraly, F. S., и Chan, Y.-M. (1978). Isolation and characterization of the sesquiterpene lactones costunolide, parthenolide, costunolide diepoxide, santamarine, and reynosin from *Magnolia grandiflora* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *67*, 347–350.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., и von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of molecular biology*, *300*, 1005–16.

Engels, B., Dahm, P., и Jennewein, S. (2008). Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metabolic engineering*, *10*, 201–6.

Ennajdaoui, H., Vachon, G., Giacalone, C., Besse, I., Sallaud, C., Herzog, M., и Tissier, A. (2010). Trichome specific expression of the tobacco (*Nicotiana*

sylvestris) cembratrien-ol synthase genes is controlled by both activating and repressing cis-regions. *Plant molecular biology*, *73*, 673–85.

Espinoza, M., Santos, L. S., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G., и Rodríguez, J. a. (2008). New gastroprotective ferruginol derivatives with selective cytotoxicity against gastric cancer cells. *Planta medica*, *74*, 802–8.

Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I. P., Troganis, A., и Boskou, D. (2002). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*, 5294–9.

Facchini, P. J., и Chappell, J. (1992). Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*, 11088–11092.

Fahim, F. A., Esmat, A. Y., Fadel, H. M., и Hassan, K. F. (1999). Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. *International journal of food sciences and nutrition*, *50*, 413–27.

Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, *108*, 229–257.

Falara, V., Akhtar, T. A., Nguyen, T. T. H., Spyropoulou, E. A., Bleeker, P. M., Schauvinhold, I., Matsuba, Y., Bonini, M. E., Schilmiller, A. L., Last, R. L., Schuurink, R. C., и Pichersky, E. (2011). The tomato terpene synthase gene family. *Plant physiology*, *157*, 770–89.

Falara, V., Fotopoulos, V., Margaritis, T., Anastasaki, T., Pateraki, I., Bosabalidis, A. M., Kafetzopoulos, D., Demetzos, C., Pichersky, E., и Kanellis, A. K. (2008). Transcriptome analysis approaches for the isolation of trichome-specific genes from the medicinal plant *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant molecular biology*, *68*, 633–51.

Falara, V., Pichersky, E., и Kanellis, A. K. (2010). A copal-8-ol diphosphate synthase from the angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* is a putative key enzyme for the formation of pharmacologically active, oxygen-containing labdane-type diterpenes. *Plant physiology*, *154*, 301–10.

Fei, Z., Tang, X., Alba, R. M., White, J. A., Ronning, C. M., Martin, G. B., Tanksley, S. D., и Giovannoni, J. J. (2004). Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. *The Plant journal*, *40*, 47–59.

Fernández-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pérez-Alvarez, J. A., и Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat science*, *69*, 371–80.

Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E. L. L., Tate, J., и Punta, M. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic acids research*, *42*, D222–30.

Fischedick, J. T., Standiford, M., Johnson, D. A., и Johnson, J. a. (2013). Structure activity relationship of phenolic diterpenes from *Salvia officinalis* as activators of the nuclear factor E2-related factor 2 pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *21*, 2618–22.

Fraga, B. M., Díaz, C. E., Guadaño, A., и González-Coloma, A. (2005). Diterpenes from *Salvia broussonetii* transformed roots and their insecticidal activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*, 5200–6.

Fridman, E., и Pichersky, E. (2005). Metabolomics, genomics, proteomics, and the identification of enzymes and their substrates and products. *Current opinion in plant biology*, *8*, 242–8.

Fridman, E., Wang, J., Iijima, Y., Froehlich, J. E., Gang, D. R., Ohlrogge, J., и Pichersky, E. (2005). Metabolic, genomic, and biochemical analyses of

glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. *The Plant cell*, *17*, 1252–67.

Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M., Taghizadeh, M., Astaneh, S., и Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, *102*, 898–904.

Gaisser, S., и Heide, L. (1996). Inhibition and regulation of shikonin biosynthesis in suspension cultures of *Lithospermum*. *Phytochemistry*, *41*, 1065–1072.

Gang, D. R., Beuerle, T., Ullmann, P., Pichersky, E., и Werck-Reichhart, D. (2002). Differential production of meta hydroxylated phenylpropanoids in sweet basil peltate glandular trichomes and leaves is controlled by the activities of specific acyltransferases and hydroxylases. *Plant physiology*, *130*, 1536–44.

Gang, D. R., Lavid, N., Zubieta, C., Chen, F., Beuerle, T., Lewinsohn, E., Noel, J. P., и Pichersky, E. (2002). Characterization of phenylpropene O-methyltransferases from sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant O-methyltransferase family. *The Plant cell*, *14*, 505–19.

Gang, D. R., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K. H., Simon, J. E., Lewinsohn, E., и Pichersky, E. (2001). An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant physiology*, *125*, 539–55.

Gao, W., Hillwig, M. L., Huang, L., Cui, G., Wang, X., Kong, J., Yang, B., и Peters, R. J. (2009). A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights. *Organic letters*, *11*, 5170–3.

Gaya, M., Repetto, V., Toneatto, J., Anesini, C., Piwien-Pilipuk, G., и Moreno, S. (2013). Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPARγ

pathways at the onset of the differentiation program. *Biochimica et biophysica acta*, *1830*, 3796–806.

Gershenzon, J., и Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, *3*, 408–14.

Gershenzon, J., Maffei, M., и Croteau, R. (1989). Biochemical and histochemical Localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant physiology*, *89*, 1351–7.

Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J. I., Mihaliak, C., Karp, F., и Croteau, R. (1992). Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Analytical biochemistry*, *200*, 130–8.

González, A. G., Andrés, L. S., Aguiar, Z. E., и Luis, J. G. (1992). Diterpenes from *Salvia mellifera* and their biogenetic significance. *Phytochemistry*, *31*, 1297–1305.

Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A., и Lommel, S. A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, *21*, 1015–26.

Greer, S., Wen, M., Bird, D., Wu, X., Samuels, L., Kunst, L., и Jetter, R. (2007). The cytochrome P450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *145*, 653–67.

Günnewich, N., Higashi, Y., Feng, X., Choi, K.-B., Schmidt, J., и Kutchan, T. M. (2013). A diterpene synthase from the clary sage *Salvia sclarea* catalyzes the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to (8R)-hydroxy-copalyl diphosphate. *Phytochemistry*, *91*, 93–9.

Guo, J., Zhou, Y. J., Hillwig, M. L., Shen, Y., Yang, L., Wang, Y., Zhang, X., Liu, W., Peters, R. J., Chen, X., Zhao, Z. K., и Huang, L. (2013). CYP76AH1

catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*, 12108–13.

Halkier, B. A., и Møller, B. L. (1991). Involvement of cytochrome P-450 in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant physiology*, *96*, 10–7.

Hall, D. E., Zerbe, P., Jancsik, S., Quesada, A. L., Dullat, H., Madilao, L. L., Yuen, M., и Bohlmann, J. (2013). Evolution of conifer diterpene synthases: diterpene resin acid biosynthesis in lodgepole pine and jack pine involves monofunctional and bifunctional diterpene synthases. *Plant physiology*, *161*, 600–16.

Hamberger, B. B., Ohnishi, T., Séguin, A., и Bohlmann, J. (2011). Evolution of diterpene metabolism: Sitka spruce CYP720B4 catalyzes multiple oxidations in resin acid biosynthesis of conifer defense against insects. *Plant physiology*, *157*, 1677–95.

Harada, E., Kim, J.-A., Meyer, A. J., Hell, R., Clemens, S., и Choi, Y.-E. (2010). Expression profiling of tobacco leaf trichomes identifies genes for biotic and abiotic stresses. *Plant & cell physiology*, *51*, 1627–37.

Haudenschild, C., Schalk, M., Karp, F., и Croteau, R. (2000). Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of biochemistry and biophysics*, *379*, 127–36.

Hayashi, K.-I., Kawaide, H., Notomi, M., Sakigi, Y., Matsuo, A., и Nozaki, H. (2006). Identification and functional analysis of bifunctional ent-kaurene synthase from the moss *Physcomitrella patens*. *FEBS letters*, *580*, 6175–81.

Hidalgo, P. J., Ubera, J. L., Tena, M. T., и Valcárcel, M. (1998). Determination of the carnosic acid content in wild and cultivated *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 2624–2627.

Hillwig, M. L., Xu, M., Toyomasu, T., Tiernan, M. S., Wei, G., Cui, G., Huang, L., и Peters, R. J. (2011). Domain loss has independently occurred multiple times in plant terpene synthase evolution. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *68*, 1051–60.

Hitzeman, R. A., Hagie, F. E., Levine, H. L., Goeddel, D. V, Ammerer, G., и Hall, B. D. (1981). Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*, *293*, 717–22.

Hoelscher, D. J., Williams, D. C., Wildung, M. R., и Croteau, R. (2003). A cDNA clone for 3-carene synthase from *Salvia stenophylla*. *Phytochemistry*, *62*, 1081–6.

Hosseinzadeh, H., и Nourbakhsh, M. (2003). Effect of Rosmarinus officinalis L. aerial parts extract on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytotherapy research*, *17*, 938–41.

Hraš, A. R., Hadolin, M., Knez, Ž., и Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, *71*, 229–233.

Huang, K. X., Huang, Q. L., Wildung, M. R., Croteau, R., и Scott, a I. (1998). Overproduction, in Escherichia coli, of soluble taxadiene synthase, a key enzyme in the *Taxol* biosynthetic pathway. *Protein expression and purification*, *13*, 90–6.

Iijima, Y., Davidovich-Rikanati, R., Fridman, E., Gang, D. R., Bar, E., Lewinsohn, E., и Pichersky, E. (2004). The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and

phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. *Plant physiology*, *136*, 3724.

Iijima, Y., Gang, D. R., Fridman, E., Lewinsohn, E., и Pichersky, E. (2004). Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant physiology*, *134*, 370–9.

Inatani, R., Fuwa, H., Seto, H., и Nakatani, N. (1982). Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, *46*, 1661–1666.

Irmler, S., Schröder, G., St-Pierre, B., Crouch, N. P., Hotze, M., Schmidt, J., Strack, D., Matern, U., и Schröder, J. (2000). Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *24*, 797–804.

Iwamoto, M., Minami, T., Tokuda, H., Ohtsu, H., и Tanaka, R. (2003). Potential antitumor promoting diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii*. *Planta medica*, *69*, 69–72.

Ji, W., Benedict, C. R., и Foster, M. A. (1993). Seasonal-variations in rubber biosynthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase, and rubber transferase activities in *Parthenium-argentatum* in the chihuahuan desert. *Plant Physiology*, *103*, 535–542.

Jia, P., Liu, H., Gao, T., и Xin, H. (2013). Glandular Trichomes and Essential Oil of *Thymus quinquecostatus*. *TheScientificWorldJournal*, *2013*, 387952.

Johnson, J. J. (2011). Carnosol: a promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer letters*, *305*, 1–7.

Jordán, M. J., Castillo, J., Bañón, S., Martínez-Conesa, C., и Sotomayor, J. A. (2014). Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of

rosemary diterpene transfer and for improving lamb meat antioxidant status. *Food chemistry*, *151*, 212–8.

Jordán, M. J., Lax, V., Martínez, C., Aouissat, M., и Sotomayor, J. A. (2011). Chemical Intraspecific Variability and Chemotype Determination of *Rosmarinus officinalis* L. in the Region of Murcia. *Acta Horticulturae*, *925*, 109–114.

Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., и Sotomayor, J. A. (2012). Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*, 9603–8.

Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., и Sotomayor, J. a. (2013). Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products*, *48*, 144–152.

Jullien, F., Moja, S., Bony, A., Legrand, S., Petit, C., Benabdelkader, T., Poirot, K., Fiorucci, S., Guitton, Y., Nicolè, F., Baudino, S., и Magnard, J.-L. (2014). Isolation and functional characterization of a τ-cadinol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Lavandula angustifolia*. *Plant molecular biology*, *84*, 227–41.

Jung, E., и Williams, K. L. (1997). The production of recombinant glycoproteins with special reference to simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnology and applied biochemistry*, *25 (Pt 1)*, 3–8.

Kaileh, M., Vanden Berghe, W., Boone, E., Essawi, T., и Haegeman, G. (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of ethnopharmacology*, *113*, 510–6.

Kanagarajan, S., Muthusamy, S., Gliszczyńska, A., Lundgren, A., и Brodelius, P. E. (2012). Functional expression and characterization of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua* L. using transient expression system in Nicotiana benthamiana. *Plant cell reports*, *31*, 1309–19.

Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., и Angenon, G. (1997). An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, *122*, 101–108.

Kapteyn, J., Qualley, A. V, Xie, Z., Fridman, E., Dudareva, N., и Gang, D. R. (2007). Evolution of Cinnamate/p-coumarate carboxyl methyltransferases and their role in the biosynthesis of methylcinnamate. *The Plant cell*, *19*, 3212–29.

Karioti, A., Skaltsa, H., Demetzos, C., Economakis, D. P. D., и Salem, A. B. (2003). Effect of nitrogen concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves of *Salvia fruticosa* Mill . in solution culture effect of nitrogen concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves of *Salvia* fruit. *Culture*. doi:10.1021/jf030308k

Karousou, R., Hanlidou, E., и Kokkini, S. (2000). The sage plants of Greece: distribution and infraspecific variation. In S. Kintzios (Ed.), *Sage. The Genus Salvia* (pp. 27–46). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Karousou, R., и Kokkini, S. (1997). Distribution and clinal variation of *Salvia fruticosa* Mill.(Labiatae) on the island of Crete (Greece). *Willdenowia*, *27*, 113–120.

Kawaide, H., Hayashi, K., Kawanabe, R., Sakigi, Y., Matsuo, A., Natsume, M., и Nozaki, H. (2011). Identification of the single amino acid involved in quenching the ent-kauranyl cation by a water molecule in ent-kaurene synthase of *Physcomitrella patens*. *The FEBS journal*, *278*, 123–33.

Keeling, C. I., Dullat, H. K., Yuen, M., Ralph, S. G., Jancsik, S., и Bohlmann, J. (2010). Identification and functional characterization of monofunctional ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in white spruce reveal different patterns for diterpene synthase evolution for primary and secondary metabolism in gymnosperms. *Plant physiology*, *152*, 1197–208.

Kera, K., Takahashi, S., Sutoh, T., Koyama, T., и Nakayama, T. (2012). Identification and characterization of a cis,trans-mixed heptaprenyl diphosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS journal*, *279*, 3813–27.

Kianbakht, S., и Dabaghian, F. H. (2013). Improved glycemic control and lipid profile in hyperlipidemic type 2 diabetic patients consuming *Salvia officinalis* L. leaf extract: A randomized placebo. Controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 2–7.

Kirby, J., Nishimoto, M., Park, J. G., Withers, S. T., Nowroozi, F., Behrendt, D., Rutledge, E. J. G., Fortman, J. L., Johnson, H. E., Anderson, J. V, и Keasling, J. D. (2010). Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, *71*, 1466–73.

Klayman, D. (1985). Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, *228*, 1049–1055.

Kliebenstein, D. J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis* thaliana tinged glasses. *Plant, Cell and Environment*, *27*, 675–684.

Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D. R., Vassão, D. G., Jackson, B. L., Kish, C. M., Orlova, I., Spassova, S. M., Lewis, N. G., Noel, J. P., Baiga, T. J., Dudareva, N., и Pichersky, E. (2006). Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*, 10128–33.

Krings, M., Kellogg, D. W., Kerp, H., и Taylor, T. N. (2003). Trichomes of the seed fern *Blanzyopteris praedentata*: implications for plant-insect interactions in the Late Carboniferous. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *141*, 133–149.

Krings, M., и Kerp, H. (1998). Epidermal anatomy of *Barthelopteris germarii* from the Upper Carboniferous and Lower Permian of France and Germany. *American journal of botany*, *85*, 553–562.

Kuhlmann, A., и Röhl, C. (2006). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro*. cultures of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*.) and their anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia. *Pharmaceutical Biology*, *44*, 401–410.

Lambers, D. H. R., и Schepers, A. (1978). The effect of trans-\-farnesene, used as a repellant against landing aphid alatae in seed potato growing. *Potato Research*, *21*, 23–26.

Lange, B. M., и Croteau, R. (1999). Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*, 13714–9.

Lange, B. M., Wildung, M. R., McCaskill, D., и Croteau, R. (1998). A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*, 2100–4.

Lange, B. M., Wildung, M. R., Stauber, E. J., Sanchez, C., Pouchnik, D., и Croteau, R. (2000). Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*, 2934–9.

Länger, R., Mechtler, C., и Jurenitsch, J. (1996). Composition of the essential oils of commercial samples of *Salvia officinalis* L. and *S. fruticosa* Miller: A comparison of oils obtained by extraction and steam distillation. *Phytochemical Analysis*, *7*, 289–293.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., и Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *23*, 2947–8.

Laskaris, G., van der Heijden R, и Verpoorte, R. (2000). Purification and partial characterisation of geranylgeranyl diphosphate synthase, from *Taxus baccata* cell cultures. An enzyme that regulates taxane biosynthesis. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, *153*, 97–105.

Latunde-Dada, A. O., Cabello-Hurtado, F., Czittrich, N., Didierjean, L., Schopfer, C., Hertkorn, N., Werck-Reichhart, D., и Ebel, J. (2001). Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase. *The Journal of biological chemistry*, *276*, 1688–95.

Leonhardt, N., Causse, M., Tissier, A., Sallaud, C., Rontein, D., Onillon, S., Jabès, F., Duffé, P., Giacalone, C., Thoraval, S., Escoffier, C., и Herbette, G. (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *The Plant Cell*, *21*, 1–17.

Li, G., Köllner, T. G., Yin, Y., Jiang, Y., Xu, Y., Gershenzon, J., Pichersky, E., и Chen, H. (2012). Correction for Li и cap., Nonseed plant *Selaginella moellendorfii* has both seed plant and microbial types of terpene synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*, 20774–20774.

Li, S., Wang, P., Deng, G., Yuan, W., и Su, Z. (2013). Cytotoxic compounds from invasive giant salvinia (*Salvinia molesta*) against human tumor cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. *23*:6682-7

Lichtenthaler, H. K. (2000). Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochemical Society transactions*, *28*, 785–9.

Linskens, M. H., Grootenhuis, P. D., Blaauw, M., Huisman-de Winkel, B., Van Ravestein, A., Van Haastert, P. J., и Heikoop, J. C. (1999). Random mutagenesis and screening of complex glycoproteins: expression of human gonadotropins in *Dictyostelium discoideum*. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *13*, 639–45.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., и Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology*, *2012*, 251364.

Lois, L. M., Campos, N., Putra, S. R., Danielsen, K., Rohmer, M., и Boronat, a. (1998). Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*, 2105–10.

Longaray Delamare, A. P., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., и Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, *100*, 603–608.

López-Jiménez, A., García-Caballero, M., Medina, M. A. Á., и Quesada, A. R. (2013). Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *European journal of nutrition*, *52*, 85–95.

Luis, J. G., Quiñones, W., Grillo, T. A., и Kishi, M. P. (1994). Diterpenes from the aerial part of *Salvia columbariae*. *Phytochemistry*, *35*, 1373–1374.

Luis, J., и Johnson, C. (2005). Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their in vitro antiradical activity. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *3*, 106–112.

Luis, J., Perez, R., и Gonzalez, F. (2007). UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. *Food Chemistry*, *101*, 1211–1215.

Lukaczer, D., Darland, G., Tripp, M., Liska, D., Lerman, R. H., Schiltz, B., и Bland, J. S. (2005). A pilot trial evaluating Meta050, a proprietary combination of reduced iso-alpha acids, rosemary extract and oleanolic acid in patients with arthritis and fibromyalgia. *Phytotherapy research: PTR*, *19*, 864–9.

Lupien, S., Karp, F., Ponnamperuma, K., Wildung, M., и Croteau, R. (1995). Cytochrome P450 limonene hydroxylases of *Mentha* species. *Drug metabolism and drug interactions*, *12*, 245–260.

Ma, D., Pu, G., Lei, C., Ma, L., Wang, H., Guo, Y., Chen, J., Du, Z., Wang, H., Li, G., Ye, H., и Liu, B. (2009). Isolation and characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis. *Plant & cell physiology*, *50*, 2146–61.

Marin, M., Koko, V., Duletić-Laušević, S., Marin, P. D., Rančić, D., и Dajić-Stevanović, Z. (2006). Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany*, *72*, 378–382.

Marks, M. D., Tian, L., Wenger, J. P., Omburo, S. N., Soto-Fuentes, W., He, J., Gang, D. R., Weiblen, G. D., и Dixon, R. A. (2009). Identification of candidate genes affecting Delta9-tetrahydrocannabinol biosynthesis in *Cannabis sativa*. *Journal of experimental botany*, *60*, 3715–26.

Martin, D. M., Fäldt, J., и Bohlmann, J. (2004). Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant physiology*, *135*, 1908–27.

Masuda, T., Inaba, Y., и Takeda, Y. (2001). Antioxidant mechanism of carnosic acid: Structural identification of two oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 5560–5565.

Matsingou, T. C., Petrakis, N., Kapsokefalou, M., и Salifoglou, A. (2003). Antioxidant activity of organic extracts from aqueous infusions of sage. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*, 6696–701.

Matsuba, Y., Nguyen, T. T. H., Wiegert, K., Falara, V., Gonzales-Vigil, E., Leong, B., Schäfer, P., Kudrna, D., Wing, R. A., Bolger, A. M., Usadel, B., Tissier, A., Fernie, A. R., Barry, C. S., и Pichersky, E. (2013). Evolution of a complex locus for terpene biosynthesis in *Solanum*. *The Plant cell*, *25*, 2022–36.

Maury, J., Asadollahi, M. A., Formenti, L. R., Schalk, M., Nielsen, J., Cordoba, E., Tissier, A., Sallaud, C., и Rontein, D. (2013). *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms*. (T. J. Bach и M. Rohmer, Eds.) (pp. 457–464). New York, NY: Springer New York.

McCaskill, D., Gershenzon, J., и Croteau, R. (1992). Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta*, *187*, 445–54.

McDowell, E. T., Kapteyn, J., Schmidt, A., Li, C., Kang, J.-H., Descour, A., Shi, F., Larson, M., Schilmiller, A., An, L., Jones, a. D., Pichersky, E., Soderlund, C. A., и Gang, D. R. (2011). Comparative functional genomic analysis of *Solanum* glandular trichome types. *Plant physiology*, *155*, 524–39.

McKee, T., и McKee, J. R. (2008). *Biochemistry: The Molecular Basis of Life* (4th ed., p. 880). Oxford University Press, USA.

Medina, I., González, M. J., Pazos, M., Della Medaglia, D., Sacchi, R., и Gallardo, J. M. (2003). Activity of plant extracts for preserving functional food containing n-3-PUFA. *European Food Research and Technology*, *217*, 301–307.

Morrone, D., Chambers, J., Lowry, L., Kim, G., Anterola, A., Bender, K., и Peters, R. J. (2009). Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in B*radyrhizobium japonicum*. *FEBS letters*, *583*, 475–80.

Mota, L., Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., Barroso, J. G., и Ascensão, L. (2013). Glandular trichomes, histochemical localization of secretion, and essential oil composition in *Plectranthus grandidentatus* growing in Portugal. *Flavour and Fragrance Journal*, *28*, 393–401.

Muhammad, I., Mossa, J. S., и El-Feraly, F. S. (1992). Antibacterial diterpenes from the leaves and seeds of *Juniperus excelsa* M. Bieb. *Phytotherapy Research*, *6*, 261–264.

Munné-Bosch, S., и Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, *210*, 925–931.

Munné-Bosch, S., и Alegre, L. (2001). Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. *Plant physiology*, *125*, 1094–102.

Munné-Bosch, S., Alegre, L., и Schwarz, K. (2000). The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis* L. under Mediterranean climate. *European Food Research and Technology*, *210*, 263–267.

Munné-Bosch, S., Schwarz, K., и Alegre, L. (1999). Enhanced formation of alpha-tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. *Plant physiology*, *121*, 1047–1052.

Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C. J., Glawischnig, E., Olsen, C. E., Halkier, B. A., и Glazebrook, J. (2007). Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *The Plant cell*, *19*, 2039–52.

Navarrete, A., Herrero, M., Martín, A., Cocero, M. J., и Ibáñez, E. (2011). Valorization of solid wastes from essential oil industry. *Journal of Food Engineering*, *104*, 196–201.

Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., и Johnson, E. F. (1991). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA and cell biology*, *10*, 1–14.

Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., и Gotoh, O. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and cell biology*, *12*, 1–51.

Nelson, D., и Werck-Reichhart, D. (2011). A P450-centric view of plant evolution. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *66*, 194–211.

Nogués, S., и Baker, N. R. (2000). Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of experimental botany*, *51*, 1309–17.

Okada, K., Kasahara, H., Yamaguchi, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., Nojiri, H., и Yamane, H. (2008). Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in Arabidopsis. *Plant & cell physiology*, *49*, 604–16.

Ono, M., Yamamoto, M., Masuoka, C., Ito, Y., Yamashita, M., и Nohara, T. (1999). Diterpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*. *Journal of natural products*, *62*, 1532–7.

Opitz, S., Nes, W. D., и Gershenzon, J. (2014). Both methylerythritol phosphate and mevalonate pathways contribute to biosynthesis of each of the major isoprenoid classes in young cotton seedlings. *Phytochemistry*, *98*, 110–9.

Ozarowski, M., Mikolajczak, P. L., Bogacz, A., Gryszczynska, A., Kujawska, M., Jodynis-Liebert, J., Piasecka, A., Napieczynska, H., Szulc, M., Kujawski, R., Bartkowiak-Wieczorek, J., Cichocka, J., Bobkiewicz-Kozlowska, T., Czerny, B., и Mrozikiewicz, P. M. (2013). *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia*, *91C*, 261–271.

Ozcan, M. (2003). Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. *Journal of medicinal food*, *6*, 267–70.

Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M., и Komaitis, M. (2008). Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*, 7254–7264.

Park, M., Han, J., Lee, C. S., Soo, B. H., Lim, K.-M., и Ha, H. (2013). Carnosic acid, a phenolic diterpene from rosemary, prevents UV-induced expression of matrix metalloproteinases in human skin fibroblasts and keratinocytes. *Experimental dermatology*, *22*, 336–41.

Pateraki, I., Andersen-Ranberg, J., Hamberger, B., Heskes, A. M., Martens, H. J., Zerbe, P., Bach, S. S., Møller, B. L. L., Bohlmann, J., и Hamberger, B. (2014). Manoyl oxide (13R), the biosynthetic precursor of forskolin, is synthesized in specialized root cork cells in *Coleus forskohlii*. *Plant physiology*. doi:10.1104/pp.113.228429

Pateraki, I., и Kanellis, A. K. (2008). Isolation and functional analysis of two *Cistus creticus* cDNAs encoding geranylgeranyl diphosphate synthase. *Phytochemistry*, *69*, 1641–52.

Pateraki, I., и Kanellis, A. K. (2010). Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant cell reports*, *29*, 629–641.

Peng, Y., Yuan, J., Liu, F., и Ye, J. (2005). Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *39*, 431–7.

Perfumi, M., Arnold, N., и Tacconi, R. (1991). Hypoglycemic activity of *Salvia fruticosa* Mill. from Cyprus. *Journal of Ethnopharmacology*, *34*, 135–140.

Peters, R. J. (2010). Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. *Natural product reports*, *27*, 1521–30.

Petiwala, S. M., Puthenveetil, A. G., и Johnson, J. J. (2013). Polyphenols from the Mediterranean herb rosemary (*Rosmarinus officinalis*) for prostate cancer. *Frontiers in pharmacology*, *4*, 29.

Pichersky, E., и Lewinsohn, E. (2011). Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annual review of plant biology*, *62*, 549–66.

Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., и Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, *17*, 15–19.

Pitarokili, D., Tzakou, O., Loukis, A., и Harvala, C. (2003). Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*, 3294–301.

Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E., и Conte, L. S. (2002). Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano

(*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *82*, 1645–1651.

Poeckel, D., Greiner, C., Verhoff, M., Rau, O., Tausch, L., Hörnig, C., Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., и Werz, O. (2008). Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical pharmacology*, *76*, 91–7.

Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., и Urban, P. (1996). Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in enzymology*, *272*, 51–64.

Post, J., van Deenen, N., Fricke, J., Kowalski, N., Wurbs, D., Schaller, H., Eisenreich, W., Huber, C., Twyman, R. M., Prüfer, D., и Gronover, C. S. (2012). Laticifer-specific cis-prenyltransferase silencing affects the rubber, triterpene, and inulin content of *Taraxacum brevicorniculatum*. *Plant physiology*, *158*, 1406–17.

Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C., и Kraut, J. (1985). The 2.6-A crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *The Journal of biological chemistry*, *260*, 16122–30.

Prisic, S., Xu, M., Wilderman, P., и Peters, R. (2004). Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. *Plant physiology*, *136*, 4228–4236.

Putievsky, E., Ravid, U., и Dudai, N. (1986). The essential oil and yield components from various plant parts of *Salvia fruticosa*. *Journal of natural products*, *49*, 1015–1017.

Rezakhanlo, A., и Talebi, S. M. (2010). Trichomes morphology of *Stachys lavandulifolia* Vahl. (Labiatae) of Iran. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, *2*, 3755–3763.

Richheimer, S. L., Bernart, M. W., King, G. A., Kent, M. C., и Bailey, D. T. (1996). Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *73*, 507–514.

Ridley, R. G. (1999). BIOMEDICINE:Enhanced: Planting the Seeds of New Antimalarial Drugs. *Science*, *285*, 1502–1503.

Ringer, K. (2003). Monoterpene double-bond reductases of the (–)-menthol biosynthetic pathway: isolation and characterization of cDNAs encoding (–)-isopiperitenone reductase and (+)-pulegone reductase of peppermint,. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *418*, 80–92.

Ringer, K. L., Davis, E. M., и Croteau, R. (2005). Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of (-)-isopiperitenol/(-)-carveol dehydrogenase of peppermint and spearmint. *Plant physiology*, *137*, 863–72.

Rivera, D., Obon, C., и Cano, F. (1994). The Botany, History And Traditional Uses Of Three-Lobed Sage (*Salvia Fruticosa* Miller) (Labiatae). *Economic Botany*, *48*, 190–195.

Ro, D., Ehlting, J., и Douglas, C. (2002). Cloning, functional expression, and subcellular localization of multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from hybrid poplar. *Plant physiology*, *130*, 1837–1851.

Ro, D.-K., Arimura, G.-I., Lau, S. Y. W., Piers, E., и Bohlmann, J. (2005). Loblolly pine abietadienol/abietadienal oxidase PtAO (CYP720B1) is a multifunctional, multisubstrate cytochrome P450 monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, 8060–5.

Ro, D.-K., и Bohlmann, J. (2006). Diterpene resin acid biosynthesis in loblolly pine (*Pinus taeda*): functional characterization of abietadiene /levopimaradiene synthase (PtTPS-LAS) cDNA and subcellular targeting of

PtTPS-LAS and abietadienol/abietadienal oxidase (PtAO, CYP720B1). *Phytochemistry*, *67*, 1572–8.

Rodríguez, J. A., Theoduloz, C., Yáñez, T., Becerra, J., и Schmeda-Hirschmann, G. (2006). Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in mice and rats: assessment of its mechanism of action using in vitro models. *Life sciences*, *78*, 2503–9.

Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., и Sahm, H. (1996). Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, *118*, 2564–2566.

Rusydi, A., Talip, N., Latip, J., Rahman, R. A., и Sharif, I. (2013). Morphology of trichomes in *Pogostemon cablin* Benth. (Lamiaceae). *Australian Journal of Crop Science*, *7*, 744–749.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., и Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, *91*, 621–632.

Saitou, N., и Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, *4*, 406–25.

Sallaud, C., Giacalone, C., Töpfer, R., Goepfert, S., Bakaher, N., Rösti, S., и Tissier, A. (2012). Characterization of two genes for the biosynthesis of the labdane diterpene Z-abienol in tobacco (*Nicotiana tabacum*) glandular trichomes. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *72*, 1–17.

Saloustros, E., Mavroudis, D., и Georgoulias, V. (2008). Paclitaxel and docetaxel in the treatment of breast cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*, *9*, 2603–16.

Santos, F. A., и Rao, V. S. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy research: PTR*, *14*, 240–4.

Sarker, S. D., и Nahar, L. (2007). Natural Product Chemistry. In *Chemistry for Pharmacy Students: general, organic, and natural product chemistry* (pp. 283–370). John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, England.

Savelev, S., Okello, E., и Perry, E. (2004). Butyryl and acetyl cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research*, *324*, 315–324.

Schalk, M., Pastore, L., Mirata, M. A., Khim, S., Schouwey, M., Deguerry, F., Pineda, V., Rocci, L., и Daviet, L. (2012). Toward a biosynthetic route to sclareol and amber odorants. *Journal of the American Chemical Society*, *134*, 18900–3.

Schepmann, H. G., Pang, J., и Matsuda, S. P. (2001). Cloning and characterization of *Ginkgo biloba* levopimaradiene synthase which catalyzes the first committed step in ginkgolide biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, *392*, 263–9.

Schilmiller, A. L., Schauvinhold, I., Larson, M., Xu, R., Charbonneau, A. L., Schmidt, A., Wilkerson, C., Last, R. L., и Pichersky, E. (2009). Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*, 10865–70.

Schmidt, T., Lenders, M., Hillebrand, A., van Deenen, N., Munt, O., Reichelt, R., Eisenreich, W., Fischer, R., Prufer, D., и Schulze Gronover, C. (2010). Characterization of rubber particles and rubber chain elongation in *Taraxacum koksaghyz*. *BMC Biochemistry*, *11*, 11.

Schuler, M. A. (1996). Plant Cytochrome P450 Monooxygenases. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *15*, 235–284.

Seki, H., Ohyama, K., Sawai, S., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., Akashi, T., Aoki, T., Saito, K., и Muranaka, T. (2008). Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 14204–9.

Seki, H., Sawai, S., Ohyama, K., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., Fukushima, E. O., Akashi, T., Aoki, T., Saito, K., и Muranaka, T. (2011). Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *The Plant cell*, *23*, 4112–23.

Shahidi, F. (1995). Stabilization of meat lipids with ground spices. *Journal of Food Lipids*, *2*, 145–153.

Sharp, H., Latif, Z., Bartholomew, B., Bright, C., Jones, C., Sarker, S., и Nash, R. (2001). Totarol, totaradiol and ferruginol: three diterpenes from *Thuja plicata* (Cupressaceae). *Biochemical systematics and ecology*, *29*, 215–217.

Al Sheef, N. B., Duletić-Laušević, S., Janošević, D., Budimir, S., Marin, M., Alimpić, A., Giweli, A.A.M.., и Marin, P.D. (2013). Micromorphology and ultrastructure of trichomes of Libyan *Salvia fruticosa* Mill. *Archives of Biological Sciences*, *65*, 239–246.

Shi, C.-Y., Yang, H., Wei, C.-L., Yu, O., Zhang, Z.-Z., Jiang, C.-J., Sun, J., Li, Y.-Y., Chen, Q., Xia, T., и Wan, X.-C. (2011). Deep sequencing of the *Camellia sinensis* transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of tea-specific compounds. *BMC genomics*, *12*, 131.

Sinclair, D., Zani, B., Donegan, S., Olliaro, P., и Garner, P. (2009). Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD007483.

Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., и Arsenakis, M. (1997). Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fructicosa* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3197–3201.

Skaltsa, H. D., Mavrommati, A., и Constantinidis, T. (2001). A chemotaxonomic investigation of volatile constituents in *Stachys subsect. Swainsonianeae* (Labiatae). *Phytochemistry*, *57*, 235–44.

Skoula, M., Abbes, J., и Johnson, C. (2000). Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* mill growing in Crete. *Biochemical systematics and ecology*, *28*, 551–561.

Skoula, M., Hilali, I. El, и Makris, A. M. (1999). Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochemical Systematics and Ecology*, *27*, 559–568.

Soković, M., Tzakou, O., Pitarokili, D., и Couladis, M. (2002). Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. *Die Nahrung*, *46*, 317–20.

Solhi, H., Salehi, B., Alimoradian, A., Pazouki, S., Taghizadeh, M., Saleh, A. M., и Kazemifar, A. M. (2013). Beneficial effects of *Rosmarinus officinalis* for treatment of opium withdrawal syndrome during addiction treatment programs: A clinical trial. *Addiction & health*, *5*, 90–4.

Son, K.-H., Oh, H.-M., Choi, S.-K., Han, D. C., и Kwon, B.-M. (2005). Anti-tumor abietane diterpenes from the cones of *Sequoia sempervirens*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *15*, 2019–21.

Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, a A., Taylor, S. V, Begley, T. P., Bringer-Meyer, S., и Sahm, H. (1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin,

and pyridoxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*, 12857–62.

Sugai, Y., Ueno, Y., Hayashi, K., Oogami, S., Toyomasu, T., Matsumoto, S., Natsume, M., Nozaki, H., и Kawaide, H. (2011). Enzymatic (13)C labeling and multidimensional NMR analysis of miltiradiene synthesized by bifunctional diterpene cyclase in *Selaginella moellendorffii*. *The Journal of biological chemistry*, *286*, 42840–7.

Sung, P.-H., Huang, F.-C., Do, Y.-Y., и Huang, P.-L. (2011). Functional expression of geraniol 10-hydroxylase reveals its dual function in the biosynthesis of terpenoid and phenylpropanoid. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*, 4637–43.

Swaminathan, S., Morrone, D., Wang, Q., Fulton, D. B., и Peters, R. J. (2009). CYP76M7 is an ent-cassadiene C11alpha-hydroxylase defining a second multifunctional diterpenoid biosynthetic gene cluster in rice. *The Plant cell*, *21*, 3315–25.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., и Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, *28*, 2731–9.

Taura, F., Tanaka, S., Taguchi, C., Fukamizu, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., и Morimoto, S. (2009). Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. *FEBS letters*, *583*, 2061–6.

Tayarani-Najaran, Z., Mousavi, S. H., Tajfard, F., Asili, J., Soltani, S., Hatamipour, M., Emami, S. A., и Ahmad Emami, S. (2013). Cytotoxic and apoptogenic properties of three isolated diterpenoids from *Salvia chorassanica* through bioassay-guided fractionation. *Food and chemical toxicology* (Vol. 57, pp. 346–51). Elsevier Ltd.

Tello, M., Kuzuyama, T., Heide, L., Noel, J. P., и Richard, S. B. (2008). The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, *65*, 1459–63.

Teoh, K. H., Polichuk, D. R., Reed, D. W., и Covello, P. S. (2009). Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Botany*, *87*, 635–642.

Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current opinion in plant biology*, *9*, 297–304.

Topcu, G., Ozturk, M., Kusman, T., Demirkoz, A. A. ., Kolak, U., и Ulubelen, A. (2013). Terpenoids, essential oil composition and fatty acids profile, and biological activities of Anatolian *Salvia fruticosa* Mill. *Turkish Journal of Chemistry*, *37*, 619–632.

Tounekti, T., Abreu, M. E., Khemira, H., и Munné-Bosch, S. (2012). Canopy position determines the photoprotective demand and antioxidant protection of leaves in salt-stressed *Salvia officinalis* L. plants. *Environmental and Experimental Botany*, *78*, 146–156.

Toyomasu, T., Kawaide, H., Ishizaki, A., Shinoda, S., Otsuka, M., Mitsuhashi, W., и Sassa, T. (2000, March). Cloning of a full-length cDNA encoding ent-kaurene synthase from *Gibberella fujikuroi*: functional analysis of a bifunctional diterpene cyclase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*.

Toyomasu, T., Niida, R., Kenmoku, H., Kanno, Y., Miura, S., Nakano, C., Shiono, Y., Mitsuhashi, W., Toshima, H., Oikawa, H., Hoshino, T., Dairi, T., Kato, N., и Sassa, T. (2008). Identification of Diterpene Biosynthetic Gene Clusters and Functional Analysis of Labdane-Related Diterpene Cyclases in *Phomopsis amygdali*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *72*, 1038–1047.

Trapp, S. C., и Croteau, R. B. (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, *158*, 811–32.

Trojáková, L., Réblová, Z., Ngueng, H. T. T., и Pokorný, J. (2001). Antioxidant activity of rosemary and sage extracts in rapeseed oil. *Journal of Food Lipids*, *8*, 1–13.

Tsutomu, N., Hitoshi, M., Masao, N., Hideko, H., и Kaisuke, Y. (1983). Production of cryptotanshinone and ferruginol in cultured cells of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, *22*, 721–722.

Tucker, A., Maciarello, M., и Howell, J. (1980). Botanical aspects of commercial sage. *Economic Botany*, *34*, 16–19.

Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E., Froehlich, J., и Croteau, R. (1999). Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant physiology*, *120*, 879–86.

Turner, G. W., и Croteau, R. (2004). Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant physiology*, *136*, 4215–27.

Ulubelen, A., Oksüz, S., Topcu, G., Gören, a C., и Voelter, W. (2001). Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia blepharochlaena*. *Journal of natural products*, *64*, 549–51.

Ulubelen, A., Meriçli, A. H., и Meriçli, F. (2004). Diterpenes and norditerpenes from the roots of *Dorystoechas hastata*. *Die Pharmazie*, *59*, 301–3.

Ulubelen, A., Oksüz, S., Kolak, U., Birman, H., и Voelter, W. (2000). Cardioactive terpenoids and a new rearranged diterpene from *Salvia syriaca*. *Planta medica*, *66*, 627–9.

Ulubelen, A., и Topcu, G. (1992). New Abietane Diterpenoids from *Salvia montbretii*. *Journal of Natural Products*, *55*, 441–444.

Ulubelen, A., Topcu, G., Eriş, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S., и Bozok-Johansson, C. (1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*, *36*, 971–4.

Vági, E., Rapavi, E., Hadolin, M., Vásárhelyiné Perédi, K., Balázs, A., Blázovics, A., и Simándi, B. (2005). Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*, 17–21.

Van Der Hoeven, R. S., Monforte, a J., Breeden, D., Tanksley, S. D., и Steffens, J. C. (2000). Genetic control and evolution of sesquiterpene biosynthesis in *Lycopersicon esculentum* and L. hirsutum. *The Plant cell*, *12*, 2283–94.

Van Herpen, T. W. J. M., Cankar, K., Nogueira, M., Bosch, D., Bouwmeester, H. J., Beekwilder, J., и Herpen, T. W. J. M. Van. (2010). *Nicotiana benthamiana* as a Production Platform for Artemisinin Precursors. *PLoS ONE*, *5*, e14222.

Vogel, B. S., Wildung, M. R., Vogel, G., и Croteau, R. (1996). Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase involved in resin acid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, *271*, 23262–8.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., и Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant journall: for cell and molecular biology*, *33*, 949–56.

Wagner, G. J., Wang, E., и Shepherd, R. W. (2004). New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of botany*, *93*, 3–11.

Wang, G., Tian, L., Aziz, N., Broun, P., Dai, X., He, J., King, A., Zhao, P. X., и Dixon, R. a. (2008). Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant physiology*, *148*, 1254–66.

Wang, H., Liu, F., Yang, L., Zu, Y., Wang, H., Qu, S., и Zhang, Y. (2011). Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chemistry*, *128*, 93–99.

Wang, J., Liu, Y., Cai, Y., Zhang, F., Xia, G., и Xiang, F. (2010). Cloning and Functional Analysis of Geraniol 10-Hydroxylase, a Cytochrome P450 from *Swertia mussotii* Franch. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *74*, 1583–1590.

Wang, Q., Hillwig, M. L., Okada, K., Yamazaki, K., Wu, Y., Swaminathan, S., Yamane, H., и Peters, R. J. (2012). Characterization of CYP76M5-8 indicates metabolic plasticity within a plant biosynthetic gene cluster. *The Journal of biological chemistry*, *287*, 6159–68.

Wang, W., Wang, Y., Zhang, Q., Qi, Y., и Guo, D. (2009). Global characterization of *Artemisia annua* glandular trichome transcriptome using 454 pyrosequencing. *BMC genomics*, *10*, 465.

Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G., и Fu, Y. J. (2008). Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, *108*, 1019–1022.

Weathers, P. J., Arsenault, P. R., Covello, P. S., McMickle, A., Teoh, K. H., и Reed, D. W. (2011). Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. *Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, *10*, 173–183.

Werck-Reichhart, D., Bak, S., и Paquette, S. (2002). Cytochromes p450. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, *1*, e0028.

Wittstock, U., и Halkier, B. A. (2000). Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. Catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *The Journal of biological chemistry*, *275*, 14659–66.

Wollenweber, E., Stevens, J. F., Ivanic, M., и Deinzer, M. L. (1998). Acylphloroglucinols and flavonoid aglycones produced by external glands on the leaves of two dryopteris ferns and currania robertiana. *Phytochemistry*, *48*, 931–939.

Wu, Y., Wang, Q., Hillwig, M. L., и Peters, R. J. (2013). Picking sides: Distinct roles for CYP76M6 and -8 in rice oryzalexin biosynthesis. *The Biochemical journal*, *216*, 209–216.

Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual review of plant biology*, *59*, 225–51.

Yang, Y., Xu, R., Ma, C.-J., Vlot, a C., Klessig, D. F., и Pichersky, E. (2008). Inactive methyl indole-3-acetic acid ester can be hydrolyzed and activated by several esterases belonging to the AtMES esterase family of Arabidopsis. *Plant physiology*, *147*, 1034–45.

Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J., и Palevitch, D. (1987). Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, *19*, 145–151.

Yerger, E. H., Grazzini, R. A., Hesk, D., Cox-Foster, D. L., Craig, R., и Mumma, R. O. (1992). A rapid method for isolating glandular trichomes. *Plant physiology*, *99*, 1–7.

Yonekura-Sakakibara, K., и Hanada, K. (2011). An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *66*, 182–93.

Yosr, Z., Hnia, C., Rim, T., и Mohamed, B. (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. typicus Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, *43*, 412–419.

Yu, G., Nguyen, T. T. H., Guo, Y., Schauvinhold, I., Auldridge, M. E., Bhuiyan, N., Ben-Israel, I., Iijima, Y., Fridman, E., Noel, J. P., и Pichersky, E. (2010). Enzymatic functions of wild tomato methylketone synthases 1 and 2. *Plant physiology*, *154*, 67–77.

Zerbe, P., Chiang, A., и Bohlmann, J. (2012). Mutational analysis of white spruce (*Picea glauca*) ent-kaurene synthase (PgKS) reveals common and distinct mechanisms of conifer diterpene synthases of general and specialized metabolism. *Phytochemistry*, *74*, 30–9.

Zheng, W., и Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 5165–5170.

Zhou, Y., Xu, G., Choi, F. F. K., Ding, L.-S., Han, Q. Bin, Song, J. Z., Qiao, C. F., Zhao, Q.-S., и Xu, H.-X. (2009). Qualitative and quantitative analysis of diterpenoids in *Salvia* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A.*, *1216*, 4847–58.

Zi, J., и Peters, R. J. (2013). Characterization of CYP76AH4 clarifies phenolic diterpenoid biosynthesis in the Lamiaceae. *Organic & biomolecular chemistry*, *11*, 7650–2.

Züst, T., Joseph, B., Shimizu, K. K., Kliebenstein, D. J., и Turnbull, L. a. (2011). Using knockout mutants to reveal the growth costs of defensive traits. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, *278*, 2598–603.

8
Прилог

```
     M  E  Q  K  L  I  S  E  E  D  L  N  G  S  M  H  N  L  A  G  A  V  P  H  R  A  L  Y  Q
   1 ATGGAACAGAAGCTAATAAGTGAGGAGGATCTGAATGGATCCATGCACAATCTCGCTGGCGCCGTTCCTCATCGCGCGCTTTATCAA
     L  A  Q  K  F  G  P  M  M  S  L  Q  L  G  E  L  S  A  V  I  I  S  S  A  D  A  A  K  E
  88 CTAGCCCAGAAGTTCGGGCCCATGATGAGCCTTCAACTCGGTGAACTCTCTGCCGTCATCATCTCCTCAGCTGATGCTGCAAAGGAA
     I  M  K  T  H  D  L  N  F  A  S  R  P  P  I  A  A  A  E  I  I  G  Y  G  C  T  S  I  T
 175 ATCATGAAAACTCACGACCTAAACTTCGCGTCGCGGCCTCCGATTGCAGCAGCAGAGATAATCGGCTACGGATGCACAAGCATCACT
     F  S  P  Y  G  D  H  W  R  Q  L  R  K  I  C  T  M  E  L  L  S  A  K  R  V  Q  S  F  R
 262 TTCAGCCCTTACGGAGACCACTGGAGGCAGCTCCGGAAGATCTGCACGATGGAGCTCCTGAGCGCGAAACGCGTGCAGTCGTTCCGG
     P  L  R  E  R  V  F  A  D  L  C  R  R  F  A  D  H  G  S  S  G  V  N  F  S  E  E  F  M
 349 CCGCTGAGGGAGAGAGTGTTTGCTGATCTGTGCAGGAGGTTTGCCGATCATGGATCATCAGGGGTCAATTTCTCGGAGGAGTTTATG
     S  A  S  Y  A  L  I  S  R  A  V  L  G  E  E  A  E  Q  H  E  G  L  L  P  N  V  K  E  I
 436 TCGGCATCGTATGCTCTGATATCGAGGGCGGTTCTCGGAGAGGAAGCGGAGCAGCATGAGGGTTTGCTGCCCAATGTGAAAGAAATT
     P  E  L  A  A  G  F  D  M  S  E  V  F  P  S  V  G  L  F  K  V  M  S  R  L  R  K  R  L
 523 CCGGAACTGGCGGCCGGATTCGATATGTCTGAGGTGTTCCCTTCCGTTGGATTGTTTAAGGTGATGAGTAGATTGAGGAAGAGGCTT
     M  A  V  H  K  D  T  D  R  I  L  N  D  V  I  H  R  H  R  V  A  E  K  K  E  H  K  D  L
 610 ATGGCTGTGCACAAAGACACGGATAGGATACTAAATGATGTGATCCATCGACACAGAGTCGCTGAAAAGAAGGAGCATAAAGATTTG
     L  D  V  L  L  K  V  E  E  D  G  L  Q  L  P  L  T  T  E  N  I  K  S  V  L  V  D  M  L
 697 CTGGATGTTCTTCTCAAAGTTGAGGAAGATGGACTCCAACTTCCTCTTACCACTGAAAACATCAAGTCTGTGCTCGTGGACATGTTA
     T  G  G  S  E  T  S  S  T  T  I  D  W  A  M  S  E  M  L  K  N  P  I  A  L  E  K  A  Q
 784 ACTGGTGGAAGTGAGACTTCATCCACAACAATAGATTGGGCAATGTCTGAAATGCTCAAAAATCCAATAGCCCTTGAAAAGGCACAA
     E  E  V  R  Q  V  F  D  E  E  G  T  V  D  E  S  R  I  P  Q  L  K  Y  L  K  S  V  V  K
 871 GAAGAAGTGAGGCAAGTTTTCGACGAAGAGGGGACTGTAGACGAATCGCGCATTCCCCAACTCAAGTATTTGAAGTCAGTTGTGAAG
     E  T  L  R  M  H  P  P  A  P  L  L  L  P  R  K  C  G  E  T  C  E  I  N  G  Y  E  I  C
 958 GAGACTCTGAGGATGCATCCACCCGCGCCTCTCTTGCTTCCAAGGAAATGCGGCGAAACATGCGAGATTAACGGATATGAAATTTGT
     A  E  T  K  I  I  I  N  A  W  A  V  N  R  D  P  K  Y  W  E  D  A  D  C  F  K  P  E  R
1045 GCAGAAACTAAAATCATCATCAATGCATGGGCTGTGAACAGAGACCCCAAATATTGGGAAGATGCAGATTGCTTTAAACCAGAGAGG
     F  M  D  S  L  V  D  F  K  G  N  H  Y  E  Y  I  P  F  G  A  G  R  R  M  C  P  G  I  G
1132 TTTATGGATAGTTTGGTGGATTTCAAGGGAAATCATTATGAATATATCCCATTTGGTGCCGGGAGGAGAATGTGCCCCGGCATAGGG
     F  G  L  A  N  V  E  L  P  L  A  M  F  L  Y  H  F  D  W  E  L  G  G  G  T  K  P  Q  D
1219 TTCGGCCTCGCCAACGTTGAGCTCCCGCTTGCAATGTTTCTGTACCATTTCGATTGGGAATTGGGTGGTGGGACGAAGCCTCAAGAT
     L  D  M  E  E  K  F  G  A  T  A  K  R  L  K  D  L  F  L  I  P  T  I  K  R  P  L  P  T
1306 TTAGATATGGAAGAAAAATTTGGGGCCACGGCTAAGAGGCTCAAAGATCTGTTTCTTATTCCAACTATTAAAAGACCTTTGCCTACC
     K  *
1393 AAATAA
```

Слика П1. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP71AxSf1* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  E  I  H  I  P  S  L  V  L  C  I  S  F  F  I  F  F  K  I  G  S  K  L  I  T  K  T  S
   1 ATGGAGATCCATATTCCATCTCTAGTGCTATGCATCTCATTCTTCATATTCTTCAAAATTGGAAGCAAATTGATAACCAAAACATCA
     N  R  K  H  L  P  L  P  P  G  P  W  K  L  P  L  I  G  N  L  H  N  L  V  G  A  L  P  H
  88 AACAGAAAACATCTCCCACTTCCTCCGGGGCCATGGAAGCTGCCCTTGATCGGAAACCTGCACAATCTCGTCGGCGCTCTTCCTCAC
     H  A  L  R  R  L  S  W  K  F  G  P  M  M  S  L  Q  L  G  E  L  S  A  V  I  I  S  S  A
 175 CACGCGCTTCGCCGCCTGTCCTGGAAGTTCGGGCCCATGATGAGCCTTCAGCTAGGCGAGCTCTCCGCCGTGATCATCTCCTCGGCT
     D  A  A  K  E  I  M  K  T  H  D  L  N  F  A  S  R  P  P  I  A  V  A  E  I  I  A  Y  G
 262 GATGCTGCAAAGGAAATCATGAAAACGCACGACCTAAACTTCGCGTCACGGCCTCCGATTGCAGTAGCAGAGATAATCGCCTACGGA
     S  T  S  I  T  F  S  P  Y  G  G  H  W  R  Q  L  R  K  I  C  T  L  E  L  L  S  A  K  R
 349 AGCACAAGCATCACTTTCAGCCCTTACGGAGGCCACTGGAGGCAGCTCCGGAAGATCTGCACGCTGGAGCTTCTGAGCGCGAAACGC
     V  Q  S  F  R  P  L  R  E  R  V  F  V  D  L  C  T  R  F  A  D  H  S  K  E  G  S  P  A
 436 GTGCAGTCGTTCCGGCCGCTGAGGGAGAGAGTGTTTGTGGATCTGTGCACGAGGTTTGCCGATCATAGCAAGGAGGGATCGCCGGCT
     V  N  F  S  E  E  F  I  S  A  T  Y  A  L  I  S  R  A  V  L  G  E  E  A  E  Q  H  E  G
 523 GTCAATTTCTCGGAGGAGTTCATCTCGGCAACGTATGCTCTGATCTCGAGGGCGGTTCTCGGAGAGGAAGCGGAGCAGCATGAGGGT
     L  L  P  N  V  K  E  M  P  D  L  T  A  G  F  D  I  S  E  V  F  P  S  V  G  L  F  K  V
 610 TTGCTGCCCAATGTGAAAGAGATGCCGGATCTGACGGCGGGATTCGATATTTCGGAGGTGTTCCCTTCCGTCGGATTGTTTAAGGTG
     M  S  R  L  R  K  R  I  V  A  V  H  K  D  T  D  R  I  L  D  D  V  I  H  Q  H  R  A  A
 697 ATGAGTAGATTGAGGAAGAGGATTGTGGCTGTGCACAAAGACACGGATAGGATTCTAGATGATGTGATCCATCAACACAGAGCTGCT
     K  S  E  E  H  K  D  L  L  D  V  L  L  Q  L  Q  E  D  G  L  E  L  P  L  T  D  E  H  V
 784 AAGAGTGAGGAGCATAAAGATTTGCTGGATGTTCTTCTCCAACTTCAGGAAGATGGACTCGAACTTCCTCTTACAGATGAACACGTC
     K  S  V  L  L  D  M  L  V  A  G  S  E  T  S  S  T  V  I  E  W  A  M  A  E  M  L  K  N
 871 AAGTCTGTGCTCTTGGATATGTTGGTTGCTGGAAGTGAGACATCCTCCACAGTAATAGAATGGGCAATGGCAGAAATGCTCAAAAAT
     P  R  I  L  E  K  A  Q  E  E  V  R  R  V  F  D  K  E  G  T  V  D  E  S  R  I  H  E  L
 958 CCAAGAATCCTTGAAAAAGCACAGGAAGAGGTGAGGCGGGTTTTCGACAAAGAGGGAACTGTAGACGAATCGCGCATTCATGAACTC
     K  Y  L  K  S  V  V  K  E  T  L  R  V  H  P  P  A  P  L  I  L  P  R  I  C  G  E  T  C
1045 AAGTATTTGAAGTCAGTTGTGAAGGAGACTCTGAGAGTGCATCCACCGGCGCCTCTCATACTTCCAAGGATATGCGGCGAAACATGC
     E  I  N  G  Y  E  I  P  A  E  T  K  I  I  V  N  A  W  A  V  N  R  D  P  K  Y  W  E  D
1132 GAGATTAATGGATACGAAATACCCGCAGAAACCAAAATCATCGTCAATGCATGGGCTGTGAATAGAGACCCCAAATATTGGGAGGAT
     P  D  C  F  K  P  E  R  F  L  D  N  L  V  D  F  R  G  N  H  F  Q  Y  I  P  F  G  A  G
1219 CCTGACTGCTTTAAACCAGAGAGATTTCTGGATAATTTGGTGGATTTCAGGGGAAATCATTTCCAATATATCCCATTTGGTGCCGGA
     R  R  M  C  P  G  I  G  F  G  L  A  N  V  D  L  P  L  A  M  F  M  Y  H  F  D  W  E  L
1306 AGGAGAATGTGCCCCGGCATAGGGTTCGGCCTAGCCAACGTTGATCTTCCGCTTGCAATGTTTATGTACCATTTCGACTGGGAATTA
     D  G  G  M  K  P  Q  D  L  D  M  E  E  K  F  G  A  T  A  K  K  L  K  D  L  F  L  I  P
1393 GATGGTGGGATGAAACCTCAAGATCTAGACATGGAAGAAAAATTTGGAGCCACGGCTAAGAAGCTTAAAGATCTGTTTCTTATTCCG
     A  I  K  R  S  L  P  T  K  *
1480 GCAATCAAAAGATCTTTGCCCACCAAATAA
```

Слика П2. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP71AxSf3* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  E  I  H  I  P  S  L  V  L  C  I  S  F  I  F  S  T  L  I  F  L  K  I  A  S  K  F  K
   1 ATGGAGATCCATATTCCATCTCTAGTGCTATGCATCTCATTCATCTTCTCCACTCTCATATTCCTGAAAATTGCAAGCAAATTCAAA
     T  K  T  S  N  L  P  P  G  P  W  K  L  P  L  I  G  N  M  H  N  L  A  G  A  V  P  H  R
  88 ACCAAAACATCAAATCTCCCTCCTGGGCCATGGAAGCTGCCCTTGATCGGAAACATGCACAATCTCGCTGGCGCCGTTCCTCATCGC
     A  L  Y  Q  L  A  Q  K  F  G  P  M  M  S  L  Q  L  G  E  L  S  A  V  I  I  S  S  A  D
 175 GCGCTTTATCAACTAGCCCAGAAGTTCGGGCCCATGATGAGCCTTCAACTCGGTGAACTCTCTGCCGTCATCATCTCCTCAGCTGAT
     A  A  K  E  I  M  K  T  H  D  L  N  F  A  S  R  P  P  I  A  A  A  E  I  I  G  Y  G  C
 262 GCTGCAAAGGAAATCATGAAAACTCACGACCTAAACTTCGCGTCGCGGCCTCCGATTGCAGCAGCAGAGATAATCGGCTACGGATGC
     T  S  I  T  F  S  P  Y  G  D  H  W  R  Q  L  R  K  I  C  T  M  E  L  L  S  A  K  R  V
 349 ACAAGCATCACTTTCAGCCCTTACGGAGACCACTGGAGGCAGCTCCGGAAGATCTGCACGATGGAGCTCCTGAGCGCGAAACGCGTG
     Q  S  F  R  P  L  R  E  R  V  F  A  D  L  C  R  R  F  A  D  H  G  S  S  G  V  N  F  S
 436 CAGTCGTTCCGGCCGCTGAGGGAGAGAGTGTTTGCTGATCTGTGCAGGAGGTTTGCCGATCATGGATCATCAGGGGTCAATTTCTCG
     E  E  F  M  S  A  S  Y  A  L  I  S  R  A  V  L  G  E  E  A  E  Q  H  E  G  L  L  P  N
 523 GAGGAGTTTATGTCGGCATCGTATGCTCTGATATCGAGGGCGGTTCTCGGAGAGGAAGCGGAGCAGCATGAGGGTTTGCTGCCCAAT
     V  K  E  I  P  E  L  A  A  G  F  D  M  S  E  V  F  P  S  V  G  L  F  K  V  M  S  R  L
 610 GTGAAAGAAATTCCGGAACTGGCGGCCGGATTCGATATGTCTGAGGTGTTCCCTTCCGTTGGATTGTTTAAGGTGATGAGTAGATTG
     R  K  R  L  M  A  V  H  K  D  T  D  R  I  L  N  D  V  I  H  R  H  R  V  A  E  K  K  E
 697 AGGAAGAGGCTTATGGCTGTGCACAAAGACACGGATAGGATACTAAATGATGTGATCCATCGACACAGAGTCGCTGAAAAGAAGGAG
     H  K  D  L  L  D  V  L  L  K  V  E  E  D  G  L  Q  L  P  L  T  T  E  N  I  K  S  V  L
 784 CATAAAGATTTGCTGGATGTTCTTCTCAAAGTTGAGGAAGATGGACTCCAACTTCCTCTTACCACTGAAAACATCAAGTCTGTGCTC
     V  D  M  L  T  G  G  S  E  T  S  S  T  T  I  D  W  A  M  S  E  M  L  K  N  P  I  A  L
 871 GTGGACATGTTAACTGGTGGAAGTGAGACTTCATCCACAACAATAGATTGGGCAATGTCTGAAATGCTCAAAAATCCAATAGCCCTT
     E  K  A  Q  E  E  V  R  Q  V  F  D  E  E  G  T  V  D  E  S  R  I  P  Q  L  K  Y  L  K
 958 GAAAAGGCACAAGAAGAAGTGAGGCAAGTTTTCGACGAAGAGGGGACTGTAGACGAATCGCGCATTCCCCAACTCAAGTATTTGAAG
     S  V  V  K  E  T  L  R  M  H  P  P  A  P  L  L  L  P  R  K  C  G  E  T  C  E  I  N  G
1045 TCAGTTGTGAAGGAGACTCTGAGGATGCATCCACCCGCGCCTCTCTTGCTTCCAAGGAAATGCGGCGAAACATGCGAGATTAACGGA
     Y  E  I  C  A  E  T  K  I  I  I  N  A  W  A  V  N  R  D  P  K  Y  W  E  D  A  D  C  F
1132 TATGAAATTTGTGCAGAAACTAAAATCATCATCAATGCATGGGCTGTGAACAGAGACCCCAAATATTGGGAAGATGCAGATTGCTTT
     K  P  E  R  F  M  D  S  L  V  D  F  R  G  N  H  F  Q  Y  I  P  F  G  A  G  R  R  M  C
1219 AAACCAGAGAGGTTTATGGATAGTTTGGTGGATTTCAGGGGAAATCATTTCCAATATATCCCATTTGGTGCCGGAAGGAGAATGTGC
     P  G  I  G  F  G  L  A  N  V  D  L  P  L  A  M  F  M  Y  H  F  D  W  E  L  D  G  G  M
1306 CCCGGCATAGGGTTCGGCCTAGCCAACGTTGATCTTCCGCTTGCAATGTTTATGTACCATTTCGACTGGGAATTAGATGGTGGGATG
     K  P  Q  D  L  D  M  E  E  K  F  G  A  T  A  K  K  L  K  D  L  F  L  I  P  A  I  K  R
1393 AAACCTCAAGATTTAGACATGGAAGAAAAATTTGGAGCCACGGCTAAGAAGCTTAAAGATCTGTTTCTTATTCCGGCAATCAAAAGA
     S  L  P  T  K  *
1480 TCTTTGCCCACCAAATAA
```

Слика П3. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP71AxSf4* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  G  L  L  D  Y  P  E  L  L  L  L  I  P  L  I  A  Y  F  L  T  R  K  H  T  L  R  S  T
   1 ATGGGCTTGTTAGATTACCCGGAGCTCCTGCTGCTAATCCCATTGATAGCCTATTTCTTGACTAGAAAACACACCCTTAGAAGCACC
     P  T  N  W  P  L  V  G  M  L  P  G  V  L  R  N  L  H  R  P  H  E  Y  L  T  Q  V  F  R
  88 CCCACCAACTGGCCTCTGGTGGGCATGCTGCCGGGCGTCCTCCGCAACCTCCACCGCCCTCACGAGTACCTAACCCAAGTCTTCCGC
     D  L  G  T  T  L  E  F  K  G  P  S  L  S  D  M  N  M  V  L  T  C  D  P  A  N  I  H  H
 175 GACCTGGGCACCACCCTCGAGTTCAAGGGCCCCTCCCTCTCCGACATGAACATGGTCCTCACCTGCGACCCGGCCAACATCCACCAC
     V  F  S  R  N  F  S  N  Y  P  K  G  P  E  F  R  K  I  F  D  I  L  G  D  G  I  F  G  A
 262 GTCTTCAGCCGGAACTTCTCCAACTACCCGAAAGGCCCTGAGTTCCGCAAGATCTTCGACATCTTGGGGGACGGCATCTTTGGCGCC
     D  F  D  L  W  E  F  H  R  K  A  T  L  S  L  L  T  H  A  D  F  Y  A  H  L  E  R  T  V
 349 GACTTCGACCTCTGGGAGTTCCACCGCAAGGCCACGCTGTCGCTGCTGACTCACGCCGATTTCTACGCCCATCTCGAGAGGACCGTG
     W  H  K  V  E  T  G  L  L  P  V  L  G  R  F  C  S  E  E  T  E  F  D  L  Q  D  V  F  Q
 436 TGGCATAAGGTCGAAACAGGGCTCCTCCCTGTCCTTGGCCGCTTCTGTAGTGAGGAAACTGAATTCGATTTGCAGGACGTTTTCCAG
     R  L  T  F  D  N  I  C  K  L  V  L  D  H  D  P  C  S  L  S  L  S  L  P  N  I  P  C  E
 523 AGGCTGACATTCGACAACATCTGCAAGCTCGTGCTCGACCACGACCCCTGCAGTCTGTCGCTCTCCCTGCCGAACATCCCCTGCGAG
     K  A  F  S  A  V  G  E  P  L  M  Y  R  H  V  I  P  E  F  I  W  K  L  Q  G  R  F  N  I
 610 AAGGCCTTCAGCGCGGTCGGGGAGCCGCTCATGTACCGCCACGTCATCCCGGAGTTTATCTGGAAGCTGCAGGGGCGGTTCAACATC
     G  R  E  R  M  L  A  E  A  A  R  A  F  H  E  F  I  Y  P  R  V  D  P  C  P  S  V  L  E
 697 GGCAGGGAGAGGATGCTGGCGGAGGCGGCGCGTGCTTTTCATGAGTTCATCTACCCGCGAGTGGATCCATGTCCGTCGGTGTTGGAA
     E  K  K  E  F  N  M  L  G  A  F  E  K  M  Y  K  E  K  N  L  G  P  V  S  G  L  R  D  F
 784 GAGAAGAAAGAGTTCAATATGTTGGGCGCTTTCGAGAAGATGTATAAGGAGAAGAATCTGGGGCCGGTTTCTGGTTTGAGGGATTTC
     L  K  D  T  S  L  S  L  I  F  A  G  R  D  T  T  S  T  S  L  T  W  L  F  W  L  I  A  Q
 871 TTGAAGGACACGTCACTGAGCTTGATCTTCGCGGGGAGGGACACCACCAGCACCTCCCTCACCTGGCTCTTCTGGCTCATCGCGCAG
     N  P  A  A  E  A  K  I  R  E  E  I  E  T  E  M  E  K  K  W  R  F  F  T  A  Q  E  S  H
 958 AATCCGGCCGCGGAGGCCAAGATCCGGGAGGAGATCGAGACGGAGATGGAAAAAAAAATGGAGATTCTTTACCGCACAGGAGTCTCAC
     R  L  K  Y  L  H  G  A  L  C  E  S  L  R  L  F  P  P  V  A  M  E  H  K  A  P  M  R  P
1045 CGGCTGAAATACCTGCACGGCGCTCTGTGCGAGTCCTTGAGGCTGTTCCCGCCGGTGGCGATGGAGCACAAGGCGCCGATGCGGCCG
     D  I  L  P  S  G  H  Y  L  R  E  N  S  K  L  I  V  C  F  Y  S  V  G  R  M  E  S  V  W
1132 GATATTCTGCCCAGCGGGCACTACCTGCGGGAGAATTCGAAGCTCATAGTGTGCTTCTATTCTGTCGGGAGAATGGAGAGCGTGTGG
     G  K  D  C  L  E  F  K  P  E  R  W  I  T  A  S  G  K  I  K  H  E  P  S  Y  K  F  P  A
1219 GGGAAGGACTGCTTGGAGTTCAAGCCGGAGAGGTGGATCACGGCGAGTGGGAAGATCAAGCACGAGCCGTCGTATAAGTTCCCGGCC
     F  N  A  G  P  R  T  C  L  G  K  E  M  A  F  I  Q  M  K  M  V  A  A  A  I  I  Y  H  Y
1306 TTCAACGCGGGGCCGAGGACTTGCTTGGGGAAGGAGATGGCGTTTATACAGATGAAGATGGTGGCGGCGGCGATTATATATCATTAC
     R  V  E  L  V  E  G  H  P  V  Y  P  R  D  S  I  I  L  Q  A  K  H  G  L  R  V  R  L  S
1393 CGTGTTGAATTAGTTGAGGGGCATCCGGTTTATCCTCGCGACTCCATTATTCTGCAAGCCAAGCATGGATTGAGAGTGAGGTTATCC
     R  V  K  *
1480 AGAGTTAAGTAA
```

Слика П4. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP96xSf2* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  G  L  L  D  Y  P  E  L  L  L  L  I  P  L  I  A  Y  F  L  T  R  K  H  T  L  R  S  T
   1 ATGGGCTTGTTAGATTACCCGGAGCTCCTGCTGCTAATCCCATTGATAGCCTATTTCTTGACTAGAAAACACACCCTTAGAAGCACC
     P  T  N  W  P  L  V  G  M  L  P  G  V  L  R  N  L  H  R  P  H  E  Y  L  T  Q  A  F  R
  88 CCCACCAACTGGCCTCTGGTGGGCATGCTGCCGGGCGTCCTCCGCAACCTCCACCGCCCTCACGAGTACCTAACCCAAGCCTTCCGC
     D  L  G  T  T  L  E  F  K  G  P  S  L  S  D  M  N  M  V  L  T  C  D  P  A  N  I  H  H
 175 GACCTCGGCACCACCCTCGAGTTCAAGGGCCCCTCCCTCTCCGACATGAACATGGTCCTCACCTGCGACCCGGCCAACATCCACCAC
     V  F  S  R  N  F  S  N  Y  P  K  G  P  E  F  R  K  I  F  D  I  L  G  D  G  I  F  G  A
 262 GTCTTCAGCCGGAACTTCTCCAACTACCCGAAAGGCCCTGAGTTCCGCAAGATCTTCGACATCTTGGGGGACGGCATCTTTGGCGCC
     D  F  D  L  W  E  F  H  R  K  A  T  L  S  L  L  T  H  A  D  F  Y  A  H  L  E  R  T  V
 349 GACTTCGACCTCTGGGAGTTCCACCGCAAGGCCACGCTGTCGCTGCTGACTCACGCCGATTTCTACGCCCATCTCGAGAGGACCGTG
     W  H  K  V  E  T  G  L  L  P  V  L  G  R  F  C  S  E  E  I  E  F  D  L  Q  D  V  F  Q
 436 TGGCATAAGGTCGAAACAGGGCTCCTCCCTGTCCTTGGCCGCTTCTGTAGTGAGGAGATTGAATTCGATTTGCAGGATGTTTTCCAG
     R  L  T  F  D  N  I  C  K  L  V  L  D  H  D  P  C  S  L  S  L  S  L  P  N  I  P  C  K
 523 AGGCTGACATTCGACAACATCTGCAAGCTCGTGCTCGACCACGACCCCTGCAGTCTGTCGCTCTCCCTGCCGAACATCCCCTGCAAG
     K  A  F  S  A  V  G  E  P  L  M  Y  R  H  V  I  P  E  F  I  W  K  L  Q  G  R  F  N  I
 610 AAGGCCTTCAGCGCGGTCGGGGAGCCGCTCATGTACCGCCACGTCATCCCGGAGTTTATCTGGAAGCTGCAGGGGCGGTTCAACATC
     G  R  E  R  M  L  A  E  A  A  R  A  F  H  E  F  I  Y  P  R  V  D  P  F  M  L  E  E  K
 697 GGCAGGGAGAGGATGCTGGCGGAGGCGGCGCGTGCTTTTCATGAGTTCATCTACCCGCGAGTGGATCCATTTATGTTGGAAGAGAAG
     N  E  F  N  M  L  G  A  F  E  K  M  Y  K  E  K  N  L  G  P  V  S  G  L  R  D  F  L  K
 784 AATGAGTTCAATATGCTGGGCGCCTTCGAGAAGATGTATAAGGAGAAGAATCTGGGGCCGGTTTCTGGTTTGAGGGATTTCTTGAAG
     D  T  S  L  S  L  I  F  A  G  R  D  T  T  S  T  S  L  T  W  L  F  W  L  I  A  Q  N  P
 871 GACACGTCACTGAGCTTGATCTTCGCGGGGAGGGACACCACCAGCACCTCCCTCACCTGGCTCTTCTGGCTCATCGCGCAGAATCCG
     A  A  E  A  K  I  R  E  E  I  E  T  E  M  E  K  K  W  R  F  F  T  A  Q  E  S  H  R  L
 958 GCAGCGGAGGCCAAGATCCGGGAGGAGATCGAGACGGAGATGGAAAAAAAATGGAGATTCTTTACCGCACAGGAGTCTCACCGGCTG
     K  Y  L  H  G  A  L  C  E  S  L  R  L  F  P  P  V  A  M  E  H  K  A  P  M  R  P  D  I
1045 AAATATCTGCACGGCGCTCTGTGCGAGTCCTTGAGGCTGTTCCCGCCGGTGGCGATGGAGCACAAGGCGCCGATGCGGCCGGATATT
     L  P  S  G  H  Y  L  R  E  N  S  K  L  I  V  C  F  Y  S  V  G  R  M  E  S  V  W  G  K
1132 CTGCCCAGCGGGCACTACCTGCGGGAGAATTCGAAGCTCATAGTGTGCTTCTATTCTGTCGGGAGAATGGAGAGCGTGTGGGGGAAG
     D  C  L  E  F  K  P  E  R  W  I  T  A  S  G  K  I  K  H  E  P  S  Y  K  F  P  A  F  N
1219 GACTGCTTGGAGTTCAAGCCGGAGAGGTGGATCACGGCGAGTGGGAAGATCAAGCACGAGCCGTCGTATAAGTTCCCGGCCTTCAAC
     A  G  P  R  T  C  L  G  K  E  M  A  F  I  Q  M  K  M  V  A  A  A  I  I  Y  H  Y  R  V
1306 GCGGGGCCGAGGACTTGCTTGGGGAAGGAGATGGCGTTTATACAGATGAAGATGGTGGCGGCGGCGATTATATATCATTACCGTGTT
     E  L  V  E  G  H  P  V  Y  P  R  D  S  I  I  L  Q  A  K  H  G  L  R  V  R  L  S  R  V
1393 GAATTAGTTGAGGGGCATCCGGTTTATCCTCGCGACTCCATTATTCTGCAAGCCAAGCATGGATTGAGAGTGAGGTTATCCAGAGTT
     K  *
1480 AAGTAA
```

Слика П5. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP96xSf3* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  D  P  F  P  L  V  A  A  A  L  F  I  A  A  T  W  F  I  T  F  K  R  R  R  N  L  P  P
   1 ATGGACCCATTCCCTCTTGTAGCTGCCGCCTTGTTCATCGCGGCGACATGGTTCATCACCTTCAAACGGCGGCGCAACCTCCCCCCG
     G  P  F  P  Y  P  I  V  G  N  M  L  Q  L  G  S  Q  P  H  E  T  F  A  K  L  S  K  K  Y
  88 GGCCCATTCCCGTACCCGATCGTGGGCAACATGCTCCAGCTGGGGTCCCAGCCCCACGAAACATTCGCGAAGCTCTCAAAGAAGTAC
     G  P  L  M  S  I  H  L  G  S  L  Y  T  V  I  I  S  S  P  E  M  A  K  E  I  M  H  K  Y
 175 GGCCCTCTGATGTCCATCCATCTCGGCAGCCTCTACACCGTGATCATCTCCTCCCCGGAGATGGCCAAGGAGATCATGCACAAATAC
     G  Q  V  F  S  G  R  T  I  A  Q  A  V  H  A  C  D  H  D  K  I  S  M  G  F  L  P  V  G
 262 GGGCAGGTCTTCTCGGGGCGCACCATCGCCCAGGCCGTCCACGCTTGCGACCACGACAAGATCTCGATGGGGTTCCTCCCCGTCGGG
     A  E  W  R  D  M  R  K  I  C  K  E  Q  M  F  S  H  Q  S  M  E  D  S  Q  N  L  R  K  Q
 349 GCCGAGTGGCGCGACATGCGCAAGATCTGCAAGGAGCAGATGTTCTCGCACCAGAGCATGGAGGACAGCCAGAACCTCCGCAAGCAG
     K  L  Q  Q  L  L  E  Y  A  Q  K  C  S  E  E  G  R  G  I  D  I  R  E  A  A  F  I  T  T
 436 AAGCTGCAGCAGCTGCTCGAGTACGCCCAAAAATGCTCCGAGGAAGGCCGGGGCATCGACATCCGCGAGGCCGCCTTCATCACCACG
     L  N  L  M  S  A  T  L  F  S  M  Q  A  T  E  F  D  S  K  V  T  M  E  F  K  E  I  I  E
 523 CTCAACCTCATGTCCGCCACGCTCTTCTCTATGCAGGCCACCGAGTTCGACTCCAAGGTCACCATGGAGTTCAAGGAGATCATCGAG
     G  V  A  S  I  V  G  V  P  N  F  A  D  Y  F  P  I  L  R  P  F  D  P  Q  G  V  K  R  R
 610 GGCGTCGCCAGCATCGTCGGCGTCCCCAACTTCGCCGACTACTTCCCCATCCTCCGCCCCTTCGACCCGCAGGGGGTCAAGCGCAGG
     A  D  V  Y  F  G  R  L  L  G  L  I  E  G  Y  L  N  E  R  I  E  F  R  K  A  N  P  N  A
 697 GCGGATGTTTACTTCGGCAGATTGCTCGGATTAATCGAGGGATATCTCAATGAAAGAATTGAATTTAGGAAGGCGAATCCTAATGCT
     P  K  K  D  D  F  L  E  T  L  V  D  A  L  D  A  K  D  Y  K  L  K  T  E  H  L  T  H  L
 784 CCGAAGAAGGATGACTTTTTGGAGACGTTAGTCGACGCCCTTGACGCCAAAGACTACAAGTTGAAGACCGAACACCTAACCCATCTC
     M  L  D  L  F  V  G  G  S  E  T  S  T  T  E  I  E  W  I  M  W  E  L  L  A  S  P  E  K
 871 ATGCTGGACTTGTTCGTGGGAGGATCTGAAACTAGCACGACAGAGATCGAGTGGATAATGTGGGAGCTGCTGGCGAGCCCAGAGAAG
     M  A  K  V  K  A  E  L  K  S  V  M  G  G  E  K  V  V  D  E  S  M  M  P  R  L  P  Y  L
 958 ATGGCGAAGGTGAAGGCAGAGCTGAAGAGCGTGATGGGGGGGGAGAAGGTGGTGGACGAGTCGATGATGCCGAGGCTGCCGTATCTG
     Q  A  V  V  K  E  S  M  R  L  H  P  P  G  P  L  L  L  P  R  K  A  E  S  D  Q  V  V  N
1045 CAAGCAGTGGTGAAGGAGTCGATGCGTCTCCACCCGCCGGGCCCACTGCTCCTCCCGCGAAAGGCGGAGAGCGATCAGGTGGTGAAC
     G  Y  L  I  P  K  G  A  Q  V  L  I  N  A  W  A  M  G  R  D  P  S  L  W  K  N  P  D  S
1132 GGCTACCTCATCCCCAAGGGGGCTCAGGTGCTCATCAACGCGTGGGCCATGGGCAGGGACCCCAGCCTCTGGAAGAATCCGGACTCA
     F  E  P  E  R  F  L  D  Q  K  I  D  F  K  G  T  D  Y  E  L  I  P  F  G  S  G  R  R  V
1219 TTCGAGCCCGAACGCTTCCTTGACCAGAAGATTGACTTCAAGGGCACGGATTACGAGCTCATCCCGTTCGGGTCGGGTAGAAGGGTC
     C  P  G  M  P  L  A  N  R  I  L  H  T  V  T  A  T  L  V  H  N  F  D  W  K  L  E  R  P
1306 TGCCCGGGCATGCCCTTGGCCAACCGAATCCTCCACACGGTCACGGCCACTCTGGTTCATAACTTCGATTGGAAACTGGAAAGGCCC
     E  A  S  D  A  H  K  G  V  L  F  G  F  A  V  R  R  A  V  P  L  K  I  V  P  I  K  A  *
1393 GAAGCCAGCGATGCACACAAAGGTGTGTTGTTTGGGTTTGCGGTGCGAAGGGCGGTTCCGCTCAAGATCGTTCCGATTAAGGCGTGA
```

Слика П6. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *SfFS* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  E  Q  K  L  I  S  E  E  D  L  N  G  S  M  E  M  D  D  F  H  F  Y  T  L  S  L  T  L
   1 ATGGAACAGAAGCTAATAAGTGAGGAGGATCTGAATGGGTCCATGGAAATGGACGACTTCCACTTCTACACACTTTCTCTCACTCTT
     L  A  L  L  Y  A  W  L  F  I  R  S  L  S  S  S  S  G  G  D  T  S  P  P  S  P  P  S  L
  88 CTCGCTCTACTCTACGCATGGCTCTTCATCAGAAGCCTGAGTTCCAGCAGCGGCGGAGACACCTCGCCTCCGTCTCCGCCATCGCTC
     P  I  I  G  N  L  H  Q  L  G  Q  L  P  H  R  S  L  S  T  L  S  Q  K  Y  G  P  L  M  L
 175 CCCATCATCGGAAATCTCCACCAACTCGGCCAGCTCCCCCACCGATCCCTCTCAACTCTGTCCCAAAAATACGGCCCGCTAATGCTT
     L  H  F  G  P  K  P  V  L  V  V  S  S  A  D  V  V  K  R  I  R  K  A  H  D  L  A  F  S
 262 CTCCACTTCGGCCCTAAGCCCGTGCTCGTGGTCTCCTCGGCCGACGTGGTGAAGCGGATACGCAAAGCCCACGACCTCGCGTTCTCC
     N  K  P  L  T  D  D  L  K  R  V  F  Y  D  G  N  D  V  F  N  L  P  Y  G  D  T  R  R  K
 349 AACAAGCCCTTGACGGATGATCTCAAGAGAGTCTTCTACGACGGGAACGACGTCTTCAACTTGCCCTACGGCGACACGCGGCGGAAG
     M  R  N  L  V  V  H  E  L  L  S  T  S  R  V  K  S  F  G  S  I  R  E  E  E  T  S  L  L
 436 ATGAGAAACCTCGTCGTGCACGAGCTGCTCAGCACCTCGCGGGTGAAGTCGTTTGGCTCCATTAGAGAAGAAGAAACATCCCTTTTA
     M  R  K  I  E  E  C  S  F  A  S  Q  P  V  N  L  T  R  I  L  A  A  F  S  N  D  L  I  S
 523 ATGAGAAAGATTGAAGAGTGTAGTTTCGCATCGCAACCGGTGAACTTGACGCGGATTTTGGCGGCGTTTTCGAATGATTTGATCAGC
     R  A  A  L  G  K  T  Y  S  E  T  R  H  G  K  L  F  L  D  V  L  E  E  G  S  R  L  L  A
 610 CGCGCCGCGCTGGGGAAGACCTACAGCGAGACGCGCCATGGGAAGCTGTTTCTAGATGTTTTGGAGGAAGGTTCTAGATTGTTGGCC
     N  L  T  L  G  D  F  I  P  W  L  A  W  I  N  R  F  N  G  R  Y  A  A  I  G  R  I  A  E
 697 AATCTCACATTAGGAGACTTTATTCCTTGGTTGGCGTGGATCAATCGTTTTAACGGCCGTTATGCTGCCATTGGTAGAATTGCTGAG
     E  R  D  A  F  L  D  A  V  I  E  D  R  L  K  S  L  D  T  S  E  E  N  I  M  G  I  L  L
 784 GAAAGGGATGCATTTCTTGATGCAGTTATTGAAGATCGCTTGAAAAGTTTAGATACAAGTGAAGAAAATATCATGGGCATCCTTCTT
     G  I  H  K  C  D  I  P  G  V  S  I  D  L  I  S  V  K  G  V  L  L  D  V  F  A  A  G  T
 871 GGAATTCACAAGTGTGACATCCCTGGTGTCTCCATTGACCTCATATCAGTCAAAGGTGTGCTTTTGGATGTATTCGCTGCTGGAACT
     E  T  T  T  T  T  L  I  W  L  M  T  E  L  L  R  H  P  T  V  M  K  K  L  Q  N  E  I  R
 958 GAGACTACGACTACTACTCTAATATGGCTAATGACAGAGCTGTTGAGGCACCCAACAGTGATGAAGAAACTGCAAAATGAAATACGA
     G  A  M  K  G  K  H  R  I  T  D  D  D  L  L  K  F  P  Y  L  K  A  V  I  K  E  T  F  R
1045 GGAGCTATGAAAGGGAAACATCGCATTACCGATGATGACTTGCTAAAATTTCCTTATTTGAAAGCTGTCATCAAAGAAACGTTTCGT
     L  H  P  P  L  P  V  F  G  R  V  T  R  D  H  V  N  L  M  G  Y  E  I  A  P  K  I  L  V
1132 TTGCATCCTCCGCTCCCGGTTTTTGGCCGCGTCACGAGGGATCATGTAAACCTAATGGGATATGAAATTGCTCCCAAAATCTTGGTC
     V  I  N  A  W  A  I  G  R  D  P  A  Y  W  D  E  P  E  K  F  M  P  E  R  F  L  N  L  S
1219 GTGATCAACGCGTGGGCTATTGGGCGGGACCCTGCCTATTGGGACGAGCCTGAGAAATTCATGCCCGAGAGGTTTTTGAATTTATCT
     M  D  F  K  G  F  D  F  H  L  I  P  F  G  F  G  R  R  I  C  P  G  L  G  F  A  T  A  T
1306 ATGGATTTTAAAGGATTTGATTTTCATTTGATTCCGTTTGGGTTCGGGCGAAGAATTTGCCCGGGCCTTGGATTTGCGACCGCAACT
     V  E  H  V  V  A  S  L  V  L  E  F  D  W  A  L  G  D  G  A  K  G  G  D  L  D  V  T  E
1393 GTGGAGCATGTGGTCGCAAGTCTTGTTCTTGAGTTTGATTGGGCATTGGGCGATGGAGCTAAAGGAGGAGATTTGGATGTAACGGAG
     L  L  G  L  T  V  V  K  D  T  P  L  I  V  F  A  T  I  S  S  K  N  *
1480 CTACTAGGCCTCACGGTTGTGAAGGATACTCCACTCATTGTTTTTGCAACTATTAGCTCCAAGAATTAA
```

Слика П7. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP71AySf1* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  E  Q  K  L  I  S  E  E  D  L  N  G  S  E  F  M  E  G  N  I  Y  S  I  V  A  A  C  F
   1 ATGGAACAGAAGCTAATAAGTGAGGAGGATCTGAATGGATCCGAATTCATGGAAGGCAACATCTACAGCATAGTTGCTGCTTGTTTC
     A  I  V  V  L  T  Y  A  W  R  L  L  N  W  A  Y  L  R  P  K  R  L  E  K  I  L  R  K  Q
  88 GCGATTGTTGTGCTAACATACGCATGGAGATTACTAAATTGGGCATATCTGAGGCCGAAGAGGCTGGAAAAGATCCTGAGGAAGCAG
     G  L  N  G  N  S  Y  K  L  V  K  G  D  M  K  E  M  M  K  A  I  Q  E  A  N  S  K  P  I
 175 GGGCTTAATGGTAATTCATACAAATTGGTGAAGGGTGACATGAAGGAGATGATGAAGGCGATCCAAGAAGCCAATTCCAAGCCGATC
     S  L  G  D  D  I  M  P  R  L  Q  P  F  L  L  K  T  I  Q  K  Y  G  K  D  C  F  Y  W  K
 262 AGTCTTGGCGATGATATCATGCCCAGATTGCAACCTTTCTCCTCAAAACCATCCAAAAATACGGAAAAGATTGCTTTTATTGGAAA
     G  P  T  P  V  I  V  I  T  E  T  E  L  I  K  E  A  L  T  K  I  S  A  F  Q  K  P  K  I
 349 GGCCCAACTCCAGTAATAGTGATCACAGAAACTGAACTAATCAAGGAAGCGTTGACCAAGATCTCCGCTTTCCAGAAGCCCAAGATA
     V  N  P  L  V  K  L  F  V  Q  G  I  F  S  Y  E  N  E  K  W  A  K  H  R  K  I  I  N  P
 436 GTGAATCCACTGGTGAAGCTGTTCGTGCAAGGGATTTTCAGCTATGAAAACGAGAAATGGGCCAAACACAGAAAAATCATCAACCCT
     A  F  H  L  E  K  L  K  L  M  T  P  A  F  Q  L  S  C  D  E  V  L  K  E  W  E  K  R  V
 523 GCTTTCCATCTCGAGAAGCTCAAGCTGATGACACCGGCCTTCCAATTGAGCTGCGATGAGGTTTTGAAGGAATGGGAAAAGCGGGTC
     S  A  E  G  W  C  E  F  D  V  Y  P  D  L  E  S  I  T  S  D  A  I  S  R  T  A  F  G  S
 610 TCGGCGGAGGGATGGTGTGAATTTGATGTTTACCCTGATTTGGAGAGCATAACAAGCGACGCCATTTCAAGAACTGCGTTTGGGAGC
     S  Y  E  E  G  R  R  I  F  E  L  Q  R  E  Q  S  A  L  I  L  K  A  M  Q  S  V  Y  I  P
 697 AGCTATGAAGAAGGTAGAAGAATCTTCGAGCTTCAACGCGAACAATCCGCCCTTATTCTCAAGGCTATGCAGTCTGTTTATATCCCA
     G  S  G  F  L  P  T  K  R  N  K  R  I  K  Q  I  Y  E  E  V  R  S  N  V  R  R  L  I  A
 784 GGATCAGGCTTTCTGCCAACAAAAAGGAACAAAAGGATAAAACAGATCTACGAAGAAGTGAGATCCAACGTCCGTCGCCTAATTGCT
     R  R  M  E  A  M  K  A  G  E  A  M  N  A  D  L  L  G  L  M  L  E  S  N  F  Q  E  I  Q
 871 AGACGAATGGAGGCGATGAAAGCAGGGGAAGCTATGAATGCAGACTTGCTGGGGTTGATGTTGGAGTCGAATTTTCAAGAGATCCAA
     Q  N  G  N  N  R  F  G  L  T  I  D  E  V  I  E  E  C  K  L  F  Y  F  A  G  Q  E  T  T
 958 CAAAATGGTAATAACAGATTTGGGCTGACCATTGACGAAGTGATCGAAGAGTGCAAGCTGTTCTATTTCGCAGGGCAGGAGACTACT
     S  I  L  L  V  W  T  L  V  L  L  S  R  Y  T  D  W  Q  E  R  A  R  E  E  V  V  R  V  F
1045 TCCATTTTGCTGGTTTGGACTCTGGTTTTGCTGAGCAGATATACAGATTGGCAGGAAAGAGCCAGGGAAGAAGTTGTGCGTGTCTTT
     G  E  E  N  P  N  F  D  G  I  N  R  L  K  I  V  N  M  I  L  H  E  V  L  R  L  Y  P  S
1132 GGGGAAGAAAACCCCAATTTCGACGGCATAAATCGCCTCAAAATCGTGAATATGATTCTGCACGAGGTGCTGAGGCTATATCCGTCG
     A  L  A  L  E  R  S  V  S  E  E  T  K  L  G  K  L  T  L  P  A  G  V  R  V  S  T  S  I
1219 GCGCTTGCTTTGGAGCGGAGCGTGAGCGAGGAGACCAAGCTGGGGAAGCTGACTCTACCAGCTGGAGTCCGGGTGTCGACTTCGATC
     I  M  V  H  H  D  R  Q  T  W  G  D  D  A  A  E  F  N  P  E  R  F  S  E  G  V  S  K  C
1306 ATCATGGTGCATCACGACCGCCAGACTTGGGGCGACGACGCGGCAGAGTTCAACCCAGAGAGATTCAGTGAGGGAGTGTCAAAGTGT
     G  G  M  F  F  P  F  G  W  G  P  R  I  C  I  G  Q  N  F  A  M  I  E  A  K  L  V  L  S
1393 GGGGGTATGTTCTTCCCCTTTGGATGGGGGCCTCGAATTTGTATAGGGCAGAATTTTGCGATGATTGAGGCAAAATTGGTGCTGTCT
     M  I  L  R  R  F  S  F  E  L  S  P  S  Y  T  H  A  P  M  A  V  F  T  T  R  P  Q  H  G
1480 ATGATACTGCGGCGCTTCTCGTTCGAGCTCTCGCCGTCGTATACGCACGCTCCCATGGCCGTCTTCACGACTCGGCCGCAACATGGG
     A  H  L  R  L  R  K  L  *
1567 GCTCATTTGCGTCTGCGCAAACTCTAG
```

Слика П8. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP72AxSf1* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  E  Q  K  L  I  S  E  E  D  L  N  G  S  M  E  V  V  V  F  I  F  Q  I  I  I  C  C  L
   1 ATGGAACAGAAGCTAATAAGTGAGGAGGATCTGAATGGATCCATGGAAGTTGTTGTATTCATATTCCAAATAATAATTTGTTGTTTA
     G  I  T  V  V  S  W  G  W  K  V  L  N  W  A  Y  L  R  P  K  K  L  E  R  M  L  R  K  Q
  88 GGCATCACGGTGGTGAGTTGGGGATGGAAAGTACTGAATTGGGCATATCTGAGGCCAAAGAAGCTGGAAAGGATGTTGAGGAAGCAG
     G  L  K  G  N  S  Y  T  L  M  Y  G  D  F  K  E  M  L  E  T  S  Q  H  A  N  S  K  P  I
 175 GGCTTGAAGGGGAATTCATACACGTTAATGTATGGCGACTTTAAGGAGATGTTGGAGACAAGCCAACATGCGAATTCCAAACCCATC
     N  L  G  D  D  I  R  P  R  V  Y  P  F  G  S  K  T  L  Q  K  Y  G  N  E  S  F  Y  W  L
 262 AATCTTGGCGACGATATCAGGCCAAGAGTCTATCCATTTGGCTCAAAGACTCTTCAAAAATACGGAAATGAATCCTTTTACTGGCTG
     G  P  M  P  M  I  N  I  T  D  V  E  L  L  K  E  V  F  A  K  H  E  V  F  Q  K  L  K  I
 349 GGGCCGATGCCGATGATCAATATCACAGATGTTGAGCTGCTTAAGGAAGTGTTCGCTAAGCATGAAGTATTTCAGAAGTTAAAGATC
     P  N  P  L  T  K  L  F  V  Q  G  L  V  S  Y  E  K  E  K  W  V  K  Q  R  K  I  I  N  P
 436 CCTAATCCGCTGACGAAGCTGTTTGTGCAAGGACTGGTGAGCTACGAGAAGGAGAAATGGGTGAAGCAAAGGAAAATCATCAATCCT
     A  F  H  L  D  K  L  K  L  M  V  P  A  F  Y  L  S  C  D  E  V  L  K  K  W  E  G  I  V
 523 GCCTTCCATCTTGACAAGCTGAAGCTCATGGTGCCAGCCTTCTACTTGAGCTGTGATGAAGTTTTGAAGAAATGGGAAGGAATTGTG
     S  S  S  S  S  S  S  S  S  C  E  V  D  V  W  P  Y  L  E  G  I  T  S  D  A  I  S  R  A
 610 TCCTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTGTGAGGTGGACGTATGGCCTTATCTAGAAGGCATAACTAGCGACGCCATATCAAGGGCT
     A  F  G  S  S  Y  K  Q  G  R  R  I  F  E  L  H  S  E  Q  T  D  H  F  L  K  A  M  M  S
 697 GCATTTGGGAGTAGCTATAAACAAGGCAGAAGAATCTTCGAGCTTCATAGCGAACAAACTGACCATTTTCTCAAAGCAATGATGTCC
     I  Y  L  P  G  F  K  F  L  P  T  K  R  N  K  R  M  N  E  I  A  R  E  V  K  S  I  L  Y
 784 ATATATCTTCCTGGATTCAAATTCCTGCCAACCAAACGGAACAAGAGAATGAATGAAATCGCAAGAGAAGTTAAGTCGATACTCTAC
     G  L  I  E  K  R  M  K  A  L  E  A  A  G  E  D  L  L  G  L  L  E  S  N  Q  R  E  M
 871 GGTCTGATAGAGAAAAGGATGAAGGCCTTGGAAGCTGCAGGTGAGGACTTGTTAGGCCTGTTGTTGGAGTCGAATCAGAGAGAAATG
     E  Q  G  G  A  R  M  S  I  D  E  V  A  E  E  C  K  L  F  Y  L  A  G  Q  E  S  T  A  T
 958 GAGCAAGGCGGCGCCAGAATGAGCATCGACGAAGTTGCTGAAGAGTGCAAACTGTTCTATTTGGCAGGGCAGGAGAGCACTGCCACT
     M  M  T  W  T  L  V  L  L  S  R  Y  P  D  W  Q  T  K  A  R  E  E  V  L  R  V  L  G  N
1045 ATGATGACTTGGACCCTAGTTTTACTGAGCAGATATCCAGATTGGCAGACAAAAGCAAGGGAGGAGGTTCTGCGTGTTTTGGGGAAC
     Q  T  P  N  L  E  S  L  N  Q  L  R  I  L  N  M  I  L  H  E  V  L  R  L  Y  P  P  L  V
1132 CAAACCCCCAATTTGGAATCCCTAAATCAACTCAGAATCCTGAATATGATCTTGCACGAGGTTTTGAGGCTTTATCCGCCATTAGTA
     T  L  D  R  Q  I  A  E  Q  T  K  L  G  K  Y  V  L  P  E  G  V  G  I  S  A  P  L  I  M
1219 ACTCTTGATCGACAAATCGCCGAGCAGACAAAGCTGGGGAAATATGTGCTACCAGAAGGTGTGGGAATCTCTGCCCCATTGATAATG
     L  H  Q  D  R  G  V  W  G  D  D  A  L  E  F  N  P  Q  R  F  S  Q  G  V  A  K  A  Q  K
1306 CTGCATCAGGATCGCGGAGTTTGGGGAGACGACGCGCTGGAATTCAATCCCCAGAGATTCAGCCAAGGAGTTGCCAAGGCGCAGAAG
     G  G  Q  G  L  Y  F  P  F  G  S  G  P  R  I  C  I  G  Q  N  F  A  M  A  E  A  E  V  V
1393 GGGGGGCAGGGTTTGTATTTCCCCTTCGGTTCGGGGCCGAGGATCTGCATCGGCCAGAATTTCGCCATGGCTGAGGCCGAAGTGGTG
     L  A  M  M  L  R  R  F  S  F  Q  L  S  P  S  Y  T  H  A  P  T  Q  S  L  T  I  H  P  Q
1480 CTGGCTATGATGCTGCGCCGCTTCTCCTTCCAGCTCTCGCCTTCCTATACGCACGCTCCTACGCAATCCCTCACCATTCATCCTCAG
     H  G  V  H  L  L  L  H  K  L  *
1567 CATGGTGTACACTTGCTTCTGCACAAACTCTAG
```

Слика П9. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP72AxSf2* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  G  N  I  E  F  H  H  E  F  L  L  L  T  P  L  L  F  I  A  W  Y  L  S  N  R  R  G  K
   1 ATGGGCAACATTGAATTCCACCACGAGTTTCTGTTGCTAACCCCTCTACTGTTTATCGCATGGTACTTGTCAAATAGAAGAGGCAAG
     K  P  P  E  P  T  M  W  P  V  L  G  M  L  P  A  V  L  M  N  L  R  R  V  H  D  Y  A  T
  88 AAGCCTCCGGAGCCGACGATGTGGCCGGTGCTGGGCATGCTGCCGGCGGTTCTCATGAACCTCCGGCGCGTACACGACTACGCGACG
     E  V  L  T  Q  C  G  G  T  Y  R  F  L  G  P  W  L  F  N  I  D  M  L  V  T  S  D  P  A
 175 GAGGTCCTGACCCAGTGCGGCGGCACGTACAGGTTCCTTGGGCCCTGGCTCTTCAACATCGACATGCTCGTCACCTCCGACCCGGCC
     N  I  H  H  V  L  S  R  N  F  S  N  Y  P  K  G  P  E  F  R  K  I  F  D  V  L  G  D  G
 262 AACATCCACCACGTCCTCAGCCGGAACTTCTCCAACTATCCCAAGGGCCCCGAGTTCCGCAAGATCTTCGACGTCTTGGGCGACGGC
     I  F  G  A  D  F  E  L  W  E  I  H  R  R  T  T  L  A  Q  L  T  H  A  D  F  N  A  Y  L
 349 ATCTTCGGCGCCGACTTCGAGCTCTGGGAGATCCACCGCCGCACCACGCTCGCGCAGCTCACGCACGCCGACTTCAACGCCTACCTC
     Q  R  T  V  W  H  K  V  E  T  G  L  F  P  V  L  D  H  F  C  A  A  G  S  D  L  D  L  Q
 436 CAGAGGACTGTTTGGCACAAGGTGGAAACCGGTCTATTTCCGGTTCTCGATCACTTCTGCGCCGCGGGATCGGATCTCGATTTGCAG
     D  I  F  Q  R  F  T  F  D  N  I  C  K  F  V  L  D  N  D  P  C  T  L  R  L  G  L  A  V
 523 GATATTTTCCAGAGATTCACTTTCGATAATATCTGCAAATTCGTGCTCGACAACGACCCCTGCACTCTCCGCCTCGGGTTGGCAGTT
     L  P  C  E  K  A  F  S  T  I  A  E  P  L  L  R  R  H  I  L  P  E  W  M  W  R  L  Q  K
 610 CTCCCCTGTGAGAAGGCCTTCAGCACGATAGCGGAGCCGCTGCTGCGGCGGCACATTCTGCCGGAGTGGATGTGGAGGCTGCAGAAG
     W  L  D  I  G  D  E  R  T  I  S  K  A  K  A  A  F  D  D  F  I  Y  P  R  V  S  G  S  G
 697 TGGCTCGACATCGGCGACGAGAGGACCATCAGTAAGGCCAAGGCCGCGTTCGATGATTTCATCTACCCGAGAGTCAGCGGAAGCGGA
     G  N  K  N  E  K  K  C  L  K  A  F  E  K  V  Y  R  E  K  N  I  S  S  S  N  G  L  R  D
 784 GGCAACAAAAATGAAAAAAAAATGTTTGAAAGCCTTCGAGAAGGTTTACAGAGAGAAGAATATTAGTTCCTCAAACGGTCTAAGGGAT
     F  L  K  D  T  S  L  S  L  M  F  A  G  R  D  T  T  S  T  C  L  T  W  L  F  W  L  V  A
 871 TTCCTCAAGGATACTTCCCTGAGCCTGATGTTCGCGGGGAGGGACACCACGAGCACGTGCCTCACGTGGCTCTTCTGGCTCGTGGCG
     Q  N  P  A  T  E  R  K  I  L  E  E  L  E  A  E  L  G  M  K  R  K  W  R  G  F  T  T  E
 958 CAGAACCCCGCCACGGAGAGGAAGATTCTGGAAGAACTGGAAGCGGAGCTTGGTATGAAGAGGAAATGGAGGGGATTCACCACGGAG
     E  S  H  K  L  V  Y  L  H  G  A  L  C  E  S  L  R  L  F  P  P  V  A  L  E  H  K  A  P
1045 GAGTCGCACAAGCTAGTATACCTGCATGGAGCTCTCTGCGAGTCGCTGCGGCTGTTCCCGCCGGTGGCGCTGGAGCACAAGGCCCCG
     V  E  A  D  V  L  P  S  G  H  Q  L  H  R  N  G  K  L  I  I  S  F  Y  S  V  G  R  M  E
1132 GTGGAAGCGGATGTGCTGCCGAGCGGGCACCAGCTCCACCGCAACGGGAAGCTGATAATATCTTTCTATTCCGTGGGGAGAATGGAG
     S  V  W  G  K  D  C  L  E  F  K  P  E  R  W  I  G  P  S  G  K  I  K  H  E  P  S  Y  K
1219 AGCGTGTGGGGGAAGGACTGCTTGGAGTTCAAGCCGGAGAGGTGGATCGGGCCGAGTGGCAAGATCAAGCACGAGCCGTCTTACAAG
     F  P  A  F  N  A  G  P  R  T  C  L  G  K  E  M  A  F  V  Q  M  K  M  V  A  A  A  I  L
1306 TTCCCGGCCTTCAACGCGGGGCCGAGGACTTGCTTGGGGAAGGAGATGGCGTTCGTGCAGATGAAGATGGTGGCGGCGGCGATACTG
     H  G  Y  E  V  R  V  V  E  G  Q  A  V  A  P  R  D  S  I  I  L  H  A  R  D  G  L  K  V
1393 CACGGGTACGAGGTGCGGGTGGTGGAGGGGCAGGCGGTTGCGCCTCGGGACTCGATCATACTGCACGCGAGGGATGGATTGAAGGTA
     Q  L  S  K  R  E  *
1480 CAGTTATCTAAGAGAGAGTGA
```

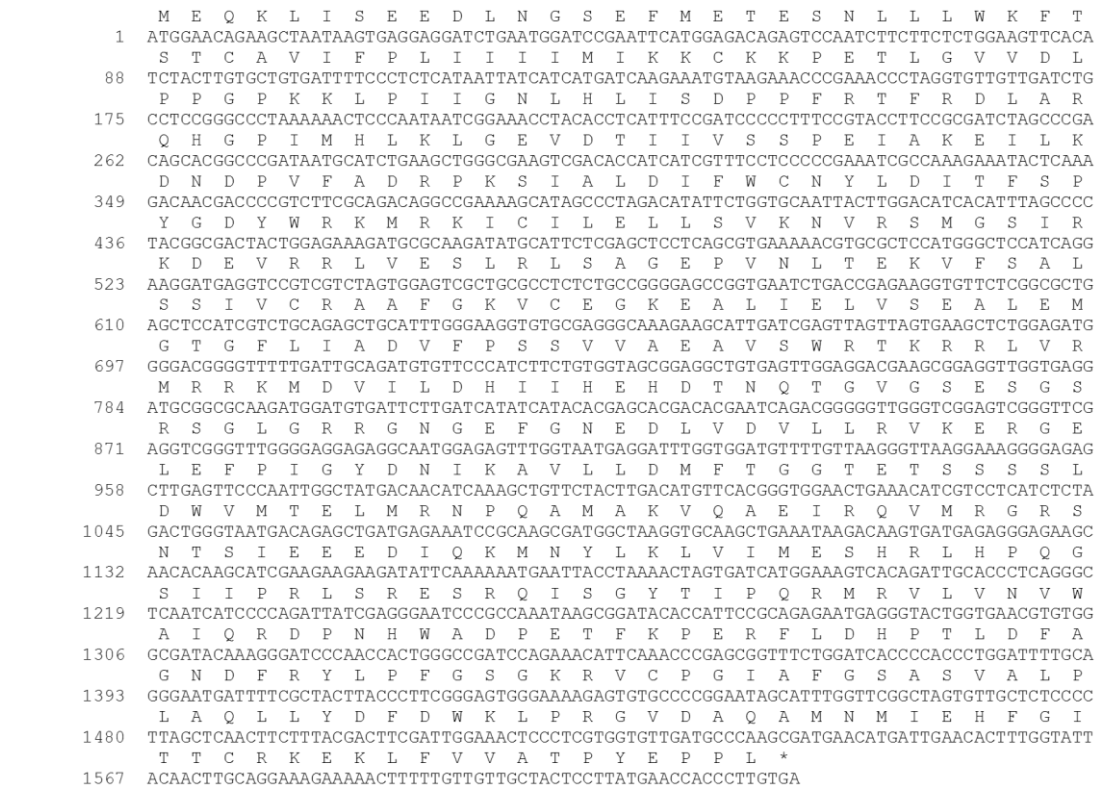
Слика П10. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP96xSf1* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  D  V  F  T  Y  T  V  S  I  S  C  G  V  V  A  L  I  Y  L  W  K  V  L  N  W  V  W  F
   1 ATGGATGTTTTCACTTATACAGTATCAATTTCTTGCGGTGTTGTAGCTCTAATATATCTATGGAAAGTATTGAATTGGGTGTGGTTT
     K  P  K  N  L  E  K  I  L  R  R  Q  G  F  K  G  N  S  Y  K  L  F  Y  G  D  F  K  E  I
  88 AAGCCCAAAAACCTCGAGAAAATCCTCCGGCGGCAGGGCTTCAAGGGCAATTCTTACAAGCTTTTCTATGGAGATTTCAAAGAAATA
     G  R  I  T  K  E  A  S  S  K  P  I  N  F  C  N  D  I  A  P  R  A  I  P  I  Y  H  Q  T
 175 GGCAGAATCACCAAAGAAGCCTCGTCCAAACCTATAAATTTTTGCAACGATATTGCGCCTAGAGCTATTCCCATCTACCACCAAACC
     S  K  N  Y  G  E  N  S  F  V  W  F  G  P  R  P  A  V  N  I  T  D  P  E  I  I  T  E  I
 262 AGCAAAAACTATGGTGAGAATAGCTTTGTCTGGTTTGGACCAAGGCCTGCAGTAAACATCACAGATCCTGAAATCATAACAGAGATT
     M  S  K  N  Y  V  F  Q  K  P  T  G  N  P  I  A  K  I  L  P  K  G  L  A  S  Y  E  T  E
 349 ATGTCTAAAAACTATGTATTCCAGAAGCCTACTGGTAATCCAATTGCTAAGATACTACCAAAAGGACTAGCATCATACGAGACTGAG
     K  W  A  K  H  R  K  L  I  N  P  A  F  H  I  E  K  L  K  H  M  V  P  S  F  Y  L  S  C
 436 AAATGGGCCAAGCACAGAAAACTCATCAATCCGGCCTTCCACATTGAGAAGCTCAAGCATATGGTTCCATCATTCTACTTGAGCTGT
     G  D  M  L  R  K  W  D  E  I  I  V  A  N  G  E  A  C  E  V  D  V  W  P  Y  L  Q  T  M
 523 GGTGATATGTTGAGAAAATGGGATGAGATAATTGTAGCAAATGGTGAAGCATGTGAAGTGGATGTGTGGCCTTATCTTCAGACAATG
     T  S  D  V  I  S  R  T  A  F  G  S  S  Y  E  E  G  R  K  I  F  E  L  Q  K  E  Q  G  K
 610 ACGAGCGATGTGATTTCAAGAACTGCGTTTGGGAGTAGCTACGAGGAAGGAAGGAAGATATTTGAACTACAAAAAGAGCAGGGCAAG
     L  I  M  V  A  T  R  S  M  H  I  P  G  W  R  F  V  P  T  K  F  N  R  R  M  K  E  I  V
 697 CTCATCATGGTGGCGACTCGCTCTATGCATATCCCTGGGTGGAGGTTTGTGCCAACGAAGTTCAATAGGAGAATGAAAGAAATTGTG
     A  K  I  E  S  L  V  L  G  I  I  N  K  R  M  K  A  M  E  A  G  E  G  S  M  D  D  L  L
 784 GCGAAGATCGAATCATTGGTGCTCGGAATCATCAACAAGAGAATGAAAGCAATGGAAGCAGGGGAAGGTAGCATGGATGACTTATTG
     G  I  L  L  E  S  N  A  K  E  M  K  Q  H  G  N  E  S  G  M  C  I  E  E  V  I  E  E  C
 871 GGAATACTATTGGAATCCAATGCCAAGGAGATGAAACAGCATGGAAATGAATCTGGAATGTGCATTGAGGAAGTGATCGAGGAGTGC
     K  L  F  Y  F  A  G  Q  E  T  T  S  S  L  L  V  W  T  M  I  L  L  S  K  H  D  D  W  Q
 958 AAACTCTTCTACTTCGCGGGCCAGGAGACCACTTCGTCTCTGCTGGTTTGGACAATGATTCTTTTAAGCAAGCACGATGACTGGCAA
     A  R  A  R  D  E  V  M  Q  V  F  G  R  G  K  P  D  Y  Q  E  L  N  H  L  K  T  V  N  M
1045 GCTCGTGCCAGGGACGAGGTTATGCAAGTTTTCGGGAGAGGGAAGCCCGACTATCAAGAGCTAAACCACTTGAAAACTGTTAACATG
     I  L  H  E  A  L  R  L  Y  P  P  A  V  M  F  T  R  F  T  H  K  E  A  R  F  G  K  I  R
1132 ATCCTCCACGAGGCTTTGAGGCTATACCCGCCGGCTGTGATGTTTACTCGGTTTACTCACAAAGAGGCTAGATTTGGGAAGATTAGG
     I  P  A  G  V  Q  L  V  L  P  V  L  A  L  H  H  D  T  R  L  W  G  D  D  A  T  N  F  K
1219 ATACCGGCAGGAGTGCAGCTTGTGCTGCCGGTGCTAGCACTGCACCATGACACCCGGCTGTGGGGGGACGATGCCACCAACTTCAAA
     P  E  R  F  A  E  G  V  S  K  A  T  Q  G  Q  P  K  F  I  P  F  G  L  G  P  R  I  C  I
1306 CCTGAGAGGTTTGCTGAGGGAGTGTCGAAGGCGACGCAAGGGCAGCCTAAGTTTATTCCGTTTGGGTTGGGGCCGAGGATCTGTATT
     G  Q  N  F  A  M  L  E  A  K  M  A  M  A  M  I  L  Q  N  Y  S  F  K  L  S  P  S  Y  I
1393 GGGCAGAACTTCGCTATGTTGGAAGCTAAGATGGCGATGGCTATGATTCTGCAGAATTATTCATTCAAGTTGTCGCCATCGTATATT
     H  A  P  H  K  V  I  T  L  Q  P  Q  H  G  A  H  L  I  L  T  K  L  *
1480 CATGCTCCTCATAAGGTCATCACTCTTCAACCTCAACATGGAGCACACTTGATTCTTACCAAACTATAA
```

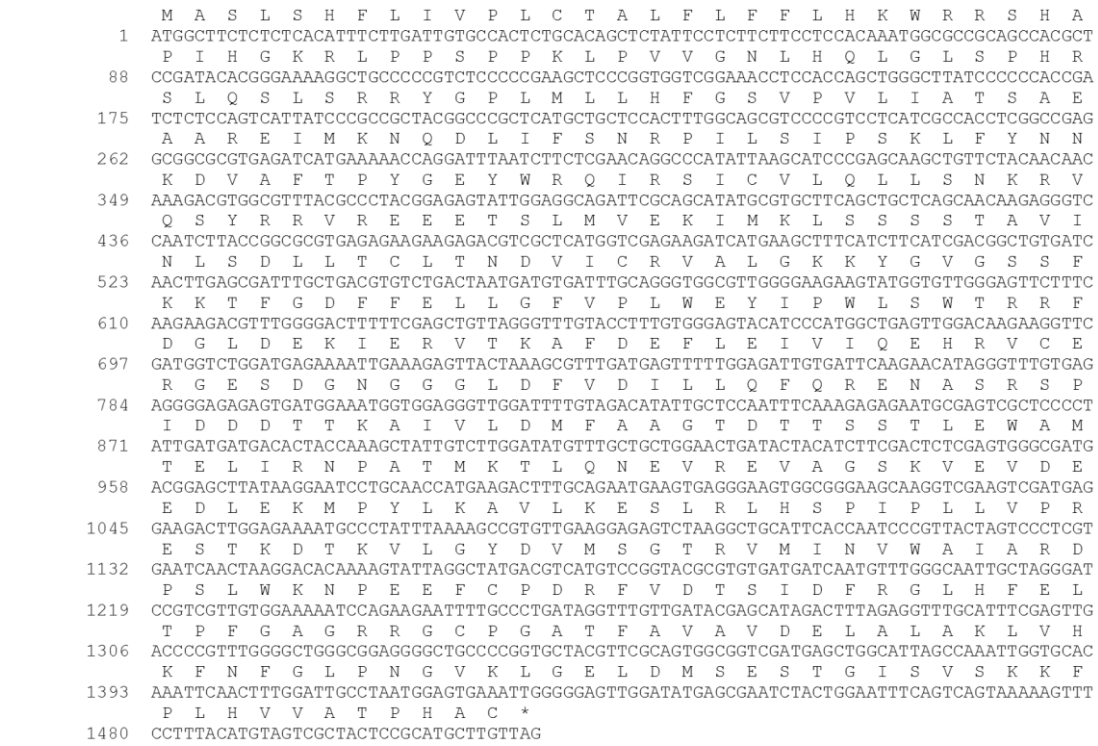
Слика П11. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP72xSf1* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  D  P  N  S  P  L  F  M  E  T  E  S  N  L  L  L  W  K  F  T  S  I  C  A  V  I  F  P
   1 ATGGATCCGAATTCGCCCTTATTCATGGAGACAGAGTCCAATCTTCTTCTCTGGAAGTTCACATCTATTTGTGCTGTGATTTTCCCT
     L  I  I  I  I  M  I  K  K  C  K  K  P  E  T  L  G  V  V  D  L  P  P  G  P  K  K  L  P
  88 CTCATAATCATCATCATGATCAAGAAATGTAAGAAACCCGAAACCCTAGGTGTTGTTGATCTGCCTCCGGGCCCTAAAAAACTCCCA
     I  I  G  N  L  H  L  I  S  D  P  P  F  R  T  F  R  D  L  A  R  Q  H  G  P  I  M  H  L
 175 ATAATCGGAAACTTACACCTCATTTCCGATCCCCCTTTCCGTACCTTCCGCGATCTAGCCCGACAGCACGGCCCGATAATGCATCTG
     K  L  G  E  V  D  T  I  V  V  S  S  P  E  I  A  K  E  I  L  K  D  N  D  P  V  F  A  D
 262 AAGCTGGGCGAAGTCGACACCATCGTCGTCTCCTCCCCCGAAATCGCCAAAGAAATACTCAAAGACAACGACCCCGTCTTCGCAGAC
     R  P  K  S  I  A  L  D  I  F  W  Y  N  Y  L  D  I  T  F  S  P  Y  G  D  Y  W  R  Q  M
 349 AGGCCGAAAAGCATAGCCCTAGACATATTTTGGTACAATTACTTGGACATCACATTTAGCCCCTACGGCGACTACTGGAGACAGATG
     R  K  I  C  I  L  E  L  L  S  A  K  N  V  R  S  M  G  S  I  R  K  D  E  V  R  R  L  V
 436 CGCAAGATATGCATTCTCGAGCTCCTCAGCGCGAAAAACGTGCGCTCCATGGGCTCCATCAGGAAGGATGAGGTCCGTCGTCTAGTG
     E  S  L  R  L  S  A  G  E  P  V  N  L  T  E  K  V  F  S  A  L  S  S  I  V  C  R  A  A
 523 GAGTCGCTGCGCCTCTCTGCCGGGGAGCCGGTGAATCTGACCGAGAAGGTGTTCTCGGCGCTGAGCTCCATCGTCTGCAGAGCTGCG
     F  G  K  V  C  E  G  K  K  A  L  I  G  L  V  S  E  A  L  E  M  G  T  G  F  L  I  A  D
 610 TTTGGGAAGGTGTGCGAGGGCAAAAAAGCGTTGATCGGGTTAGTTAGTGAAGCTCTGGAGATGGGGACGGGGTTTTTGATTGCAGAT
     V  F  P  S  S  V  V  A  E  A  V  S  W  R  T  K  R  R  L  V  R  M  R  R  K  M  D  V  I
 697 GTGTTCCCATCTTCTGTGGTAGCGGAGGCTGTGAGTTGGAGGACGAAGCGGAGGTTGGTGAGGATGCGGCGCAAGATGGATGTGATT
     L  D  H  I  I  H  E  H  D  T  N  Q  T  G  V  G  A  G  V  E  S  G  S  G  S  G  L  G  R
 784 CTTGATCATATCATACACGAGCACGACACGAATCAGACTGGGGTCGGGGCCGGGGTGGAGTCAGGTTCGGGGTCGGGTTTGGGGAGG
     R  G  N  G  E  F  G  N  E  D  L  V  D  V  L  L  R  V  K  E  R  G  E  L  E  F  P  I  G
 871 AGAGGCAATGGAGAGTTTGGTAATGAGGATTTGGTGGATGTTTTGCTAAGGGTTAAGGAAAGGGGAGAGCTTGAGTTCCCAATTGGC
     Y  D  N  I  K  A  V  L  L  D  M  F  T  G  G  T  E  T  S  S  S  S  L  D  W  V  M  T  E
 958 TATGACAACATCAAAGCTGTTCTACTTGACATGTTCACGGGTGGAACTGAAACATCGTCCTCATCTCTAGACTGGGTAATGACAGAG
     L  M  R  N  P  Q  A  M  A  K  V  Q  A  E  I  R  Q  V  M  R  G  R  S  N  T  S  I  E  E
1045 CTGATGAGAAATCCGCAAGCGATGGCTAAGGTGCAAGCTGAAATAAGACAAGTGATGAGAGGGAGAAGCAACACAAGCATCGAAGAA
     E  D  I  Q  K  M  N  Y  L  K  L  V  I  M  E  S  H  R  L  H  P  Q  G  S  I  I  P  R  L
1132 GAAGATATTCAAAAAATGAATTACCTAAAACTAGTGATCATGGAAAGTCACAGATTGCACCCTCAGGGCTCAATCATCCCCAGATTA
     S  R  E  S  R  Q  I  S  G  Y  T  I  P  E  R  M  K  V  L  V  N  V  W  A  I  Q  R  D  P
1219 TCGAGGGAATCCCGCCAAATAAGCGGATACACCATCCCGGAGAGAATGAAGGTACTGGTGAACGTGTGGGCGATACAAAGGGATCCC
     N  H  W  A  D  P  K  T  F  K  P  E  R  F  L  D  H  P  T  L  D  F  A  G  N  D  A  R  Y
1306 AACCACTGGGCCGATCCAAAAACATCAAACCCGAGCGGTTTCTGGATCACCCCACCCTGGATTTTGCAGGGAATGATGCCCGCTAC
     L  P  F  G  S  G  K  R  V  C  P  G  I  A  F  G  S  A  S  V  A  L  P  L  A  Q  L  L  Y
1393 TTGCCCTTCGGGAGTGGGAAAAGAGTGTGCCCCGGGATAGCATTTGGTTCGGCTAGTGTTGCTCTCCCCTTAGCTCAACTTCTTTAC
     D  F  D  W  K  L  P  R  G  V  D  A  Q  A  M  N  M  I  E  H  F  G  I  T  T  C  R  K  E
1480 GACTTCGACTGGAAACTCCCTCGTGGTGTTGATGCCCAAGCGATGAACATGATTGAACACTTTGGTATTACAACTTGCAGGAAAGAA
     K  L  F  V  V  A  T  P  Y  E  P  P  L  *
1567 AAACTTTTTGTTGTTGCTACTCCTTATGAACCACCCTTGTGA
```

Слика П12. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP71DSf2* биљке *Salvia fruticosa*.



Слика П13. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP71DSf3* биљке *Salvia fruticosa*.



Слика П14. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP71AxSf2* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  A  S  L  S  H  F  L  I  V  P  L  C  T  A  L  F  L  F  F  L  H  K  W  R  R  S  H  A
   1 ATGGCTTCTCTCTCACATTTCTTGATTGTGCCACTCTGCACAGCTCTATTCCTCTTCTTCCTCCACAAATGGCGCCGCAGCCACGCT
     P  K  P  G  K  R  L  P  P  S  P  P  K  L  P  V  V  G  N  L  H  Q  L  G  L  S  P  H  R
  88 CCGAAACCCGGGAAAAGGCTGCCCCCGTCTCCACCGAAGCTCCCGGTGGTCGGAAACCTCCACCAGCTGGGCTTATCCCCCCACCGA
     S  L  Q  S  L  S  R  R  Y  G  P  L  M  L  L  H  F  G  S  V  P  T  L  I  A  S  S  A  E
 175 TCTCTCCAGTCATTATCCCGCCGCTACGGCCCGCTCATGCTGCTCCACTTCGGCAGCGTCCCCACCCTCATCGCGTCCTCGGCCGAG
     A  A  R  E  I  M  K  N  Q  D  L  I  F  S  N  R  P  K  L  S  I  P  S  K  L  L  Y  N  N
 262 GCGGCGCGTGAGATCATGAAAAACCAGGATTTAATCTTCTCGAACAGGCCCAAGTTAAGCATCCCGAGCAAGCTGTTGTACAACAAC
     K  D  V  A  F  S  P  Y  Y  G  E  Y  W  R  Q  I  R  S  I  C  V  L  Q  L  L  R  N  K  R  V
 349 AAAGACGTGGCGTTTTCGCCCTACGGAGAGTATTGGCGGCAGATTCGCAGCATATGCGTGCTTCAGCTGCTCAGAAACAAAAGGGTC
     Q  S  Y  R  H  V  R  E  E  E  T  S  L  M  V  E  K  I  M  E  L  R  S  S  S  M  A  V  I
 436 CAATCTTACCGGCACGTGAGGGAAGAGGAGACGTCGCTCATGGTGGAGAAGATCATGGAGCTAAGATCTTCGTCGATGGCTGTGATC
     N  L  S  D  L  L  T  C  L  T  N  D  V  I  C  R  V  A  L  G  K  K  Y  G  V  G  S  S  F
 523 AACTTGAGCGATTTGCTGACATGTCTGACTAATGATGTGATTTGCAGGGTAGCGTTGGGGAAGAAGTATGGTGTAGGGAGTTCTTTC
     K  K  T  F  G  D  F  F  E  L  L  G  F  V  P  L  W  E  Y  I  P  W  L  S  W  T  R  R  F
 610 AAGAAGACGTTTGGGGACTTTTTCGAGCTATTGGGGTTTGTACCTTTGTGGGAGTACATCCCATGGCTGAGTTGGACTAGAAGGTTC
     D  G  L  D  E  K  I  E  R  V  V  K  A  F  D  E  F  L  E  I  V  I  Q  E  H  R  V  C  E
 697 GATGGTCTGGATGAGAAAATTGAAAGAGTTGTTAAAGCGTTTGATGAGTTTTTGGAGATTGTGATTCAAGAACATAGGGTTTGTGAG
     R  G  E  S  D  G  N  G  G  G  L  D  F  V  D  I  L  L  Q  F  Q  R  E  N  A  S  R  S  P
 784 AGGGGAGAGAGTGATGGAAATGGTGGAGGGTTGGATTTTGTAGACATATTGCTCCAATTTCAAAGAGAGAATGCGAGTCGCTCCCCT
     I  D  D  D  T  I  K  A  I  V  L  D  M  F  A  A  G  T  D  T  T  S  S  A  L  E  W  A  M
 871 ATTGATGATGACACTATCAAAGCTATTGTCTTGGATATGTTTGCTGCTGGAACTGATACTACATCTTCGGCTCTCGAGTGGGCGATG
     T  E  L  I  R  K  P  A  T  M  K  T  L  Q  N  E  V  R  E  V  A  G  S  K  V  E  V  D  E
 958 ACGGAGCTTATAAGGAAACCGGCAACCATGAAGACATTGCAGAATGAAGTGAGGGAAGTGGCGGGAAGCAAGGTCGAAGTCGATGAG
     E  D  L  E  K  M  P  Y  L  K  A  V  L  K  E  S  L  R  L  H  S  P  V  P  L  L  V  P  R
1045 GAAGACTTGGAGAAAATGCCCTATTTAAAAGCCGTGTTGAAGGAGAGTCTAAGGCTGCATTCACCAGTCCCGTTACTAGTCCCTCGT
     E  S  T  Q  D  T  K  V  L  G  Y  D  V  V  S  G  T  R  V  M  I  N  A  W  A  I  A  R  D
1132 GAATCAACTCAGGACACAAAAGTATTGGGCTATGACGTCGTGTCCGGTACGCGTGTGATGATTAATGCTTGGGCAATTGCTAGAGAT
     P  L  L  W  E  N  P  E  E  F  R  P  E  R  F  L  E  T  S  I  D  F  R  G  L  H  F  E  L
1219 CCGTTGTTGTGGGAAAATCCAGAAGAATTTCGCCCTGAGAGGTTTCTTGAGACGAGCATAGACTTTAGAGGTTTGCATTTCGAGTTG
     T  P  F  G  A  G  R  R  G  C  P  G  A  T  F  A  V  A  V  D  E  L  A  L  A  K  L  V  H
1306 ACCCCGTTCGGGGCTGGTCGGAGGGGCTGCCCCGGTGCTACGTTCGCAGTGGCGGTTGATGAGCTGGCATTAGCCAAATTGGTGCAC
     K  F  D  F  G  L  P  N  E  V  K  W  E  E  L  D  S  E  S  S  G  I  S  I  R  K  K  F  P
1393 AAATTCGACTTCGGATTGCCTAATGAAGTGAAATGGGAGGAGTTAGATAGTGAATCTAGTGGAATATCAATCCGTAAAAAGTTTCCT
     L  L  I  V  A  T  P  H  A  C  *
1480 TTACTTATAGTTGCTACTCCGCATGCTTGTTAG
```

Слика П15. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP71ASf4* биљке *Salvia fruticosa*.

```
     M  S  H  P  T  P  S  S  R  S  S  Q  P  P  R  K  I  L  H  S  N  P  S  A  S  N  G  S  I
   1 ATGTCTCATCCCACACCATCGTCGAGATCCTCTCAGCCTCCTCGGAAAATCCTTCATTCAAACCCATCAGCAAGCAATGGCTCGATC
     G  L  S  N  H  T  S  S  S  C  I  S  P  N  Q  N  S  V  S  P  S  T  N  W  S  C  I  S  V
  88 GGATTGTCGAACCATACTTCGTCAAGCTGCATTTCACCAAACCAAAACTCGGTATCGCCATCCACCAATTGGAGCTGCATTTCTGTG
     A  G  E  N  N  A  I  L  D  E  L  E  S  A  Q  N  Y  I  M  E  I  L  I  P  S  L  G  V  C
 175 GCAGGGGAAAACAATGCCATTTTGGACGAGTTGGAATCTGCACAGAATTACATCATGGAGATCCTGATTCCATCTCTAGGGGTGTGC
     I  S  F  L  L  L  S  T  L  I  F  F  K  L  K  T  E  K  S  N  G  K  F  P  P  G  P  W  K
 262 ATCTCATTCTTGTTGTTGTCCACTCTCATTTTCTTCAAATTGAAAACCGAAAAATCAAATGGAAAATTCCCTCCCGGGCCATGGAAG
     L  P  L  I  G  N  L  H  S  L  V  G  A  I  P  H  R  A  L  H  Q  L  A  E  K  F  G  P  M
 349 CTGCCCTTGATTGGGAACCTGCACAGTCTGGTGGGCGCTATTCCTCATCGCGCGCTTCACCAGCTGGCCGAGAAGTTCGGGCCCATG
     M  G  I  Q  I  G  E  L  S  A  V  I  I  S  S  A  D  A  A  K  E  I  M  K  T  H  D  I  N
 436 ATGGGGATTCAGATAGGTGAACTCTCTGCTGTAATCATTTCCTCTGCTGATGCTGCAAAGGAAATAATGAAAACTCACGACATAAAC
     F  A  S  R  P  Q  I  T  I  I  G  N  G  S  T  T  I  S  F  S  P  Y  G  D  Y  W  R  Q  L
 523 TTCGCGTCACGGCCACAGATTACAATCATCGGCAATGGGAGCACCACAATCTCCTTCAGCCCTTACGGCGATTACTGGAGGCAGCTC
     R  K  I  C  T  L  E  L  L  S  A  K  R  V  Q  S  F  R  W  M  R  E  E  V  F  V  E  L  S
 610 CGGAAGATCTGCACGTTGGAGCTTCTGAGCGCAAAACGCGTGCAGTCGTTCCGATGGATGAGAGAGGAAGTGTTCGTTGAACTTAGC
     R  R  F  A  S  M  E  G  S  A  I  N  L  S  E  E  L  N  S  A  A  Y  S  I  V  T  R  A  T
 697 AGGAGGTTTGCCTCCATGGAGGGATCGGCGATCAATTTATCGGAGGAGCTCAACTCTGCGGCGTATTCTATTGTTACGAGGGCAACC
     I  G  E  E  H  E  G  L  L  P  Y  L  K  E  L  P  T  L  A  S  G  L  D  I  S  E  V  F  P
 784 ATCGGTGAGGAGCACGAGGGTTTGCTCCCCTATTTAAAAGAATTACCCACATTGGCATCGGGACTGGATATTTCGGAAGTGTTCCCT
     S  I  K  L  F  K  V  M  S  R  L  R  K  R  L  M  A  I  F  K  D  I  D  R  M  L  D  D  I
 871 TCTATCAAATTGTTTAAGGTGATGAGTAGACTGAGGAAGAGGTTGATGGCTATATTCAAAGACATAGATAGGATGCTAGATGATATA
     I  H  Q  K  R  I  N  A  N  P  A  K  H  E  D  L  L  D  V  L  L  K  Y  E  Q  D  G  L  T
 958 ATCCACCAGAAAAGAATTAATGCCAATCCTGCCAAGCATGAAGATCTGCTGGATGTTCTTCTCAAATATGAGCAAGATGGACTTACA
     T  E  N  I  K  S  L  L  V  D  L  L  A  A  G  T  E  T  S  S  T  A  I  E  W  A  M  S  E
1045 ACTGAAAACATCAAGTCTCTGCTCGTGGACTTATTGGCTGCTGGAACTGAGACATCTTCCACAGCAATTGAGTGGGCAATGTCTGAA
     L  L  R  N  P  R  V  L  Q  K  A  Q  E  E  V  R  Q  V  F  D  E  E  G  Y  V  D  E  S  R
1132 CTGCTCAGAAATCCAAGAGTCCTCCAAAAGGCACAAGAAGAGGTGAGGCAGGTTTTCGATGAAGAGGGATATGTAGACGAATCGCGC
     I  P  Q  L  K  Y  M  L  S  V  L  K  E  T  L  R  M  H  P  P  A  P  L  L  L  P  R  K  C
1219 ATTCCCCAACTCAAGTATATGTTGTCAGTCTTGAAAGAGACTCTGCGGATGCATCCCCCGGCGCCTCTCTTACTTCCAAGAAAATGC
     R  E  A  C  E  V  N  G  Y  E  I  P  A  E  T  K  I  I  V  N  A  W  A  V  N  R  D  P  K
1306 AGGGAAGCGTGTGAGGTTAATGGATATGAAATACCTGCAGAAACCAAAATCATCGTCAACGCATGGGCTGTAAACAGAGACCCCAAG
     Y  W  E  D  P  H  C  F  K  P  E  R  F  L  D  S  S  V  D  F  K  G  N  H  F  E  Y  I  P
1393 TATTGGGAAGATCCTCACTGCTTTAAACCAGAGAGATTTTTGGATAGTTCCGTGGATTTCAAGGGAAATCATTTCGAATATATTCCA
     F  G  A  G  R  R  I  C  P  G  M  T  F  G  L  A  N  V  Q  F  P  L  A  L  F  L  Y  H  F
1480 TTTGGCGCTGGAAGGAGAATCTGCCCTGGCATGACGTTCGGCCTCGCCAATGTTCAGTTTCCACTTGCACTGTTTCTGTACCATTTC
     D  W  K  L  G  G  G  I  K  P  Q  D  L  D  M  E  E  G  F  G  I  T  S  P  R  R  N  N  L
1567 GATTGGAAATTAGGTGGTGGGATAAAGCCTCAAGATTTGGATATGGAAGAAGGATTTGGCATCACTTCTCCCAGGCGCAACAATCTG
     V  L  V  P  A  I  K  R  P  L  P  A  I  K  *
1654 GTTCTTGTTCCGGCTATCAAAAGACCTTTGCCGGCCATCAAATAA
```

Слика П16. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP71AxR01* биљке *Rosmarinus officinalis*.

```
     M  E  E  I  Q  F  N  P  F  I  L  T  A  L  L  S  L  V  L  L  W  S  I  N  Q  I  F  L  K
   1 ATGGAGGAAATTCAGTTCAATCCATTTATCCTCACAGCTCTTCTCTCCCTCGTTTTGCTGTGGTCCATTAACCAAATCTTCCTCAAA
     S  S  K  K  I  K  L  P  P  S  P  S  K  L  P  I  I  G  N  L  H  Q  L  S  S  L  P  H  R
  88 TCCTCAAAGAAAATAAAACTCCCCCCTTCACCATCAAAGCTGCCTATAATTGGAAACCTACATCAGCTTAGCTCACTTCCCCACCGC
     D  L  H  S  L  A  Q  K  H  G  P  I  L  L  L  H  F  G  S  A  P  V  L  I  V  S  S  A  D
 175 GATCTCCATTCCTTAGCCCAAAAACACGGTCCAATCCTGCTTCTTCACTTCGGAAGCGCCCCCGTTCTGATCGTCTCCTCGGCCGAT
     L  A  R  E  I  M  R  T  H  D  L  I  F  A  N  R  P  E  F  K  A  M  K  K  L  L  Y  G  C
 262 TTGGCCCGCGAAATCATGAGAACTCACGATCTCATCTTCGCGAACAGGCCAGAGTTCAAGGCCATGAAGAAGCTGCTCTACGGCTGC
     K  D  I  G  T  A  P  Y  G  E  Y  W  R  K  M  K  S  I  F  V  L  Q  M  M  S  N  K  R  V
 349 AAAGACATCGGAACTGCCCCTTACGGCGAATACTGGAGAAAGATGAAGAGCATTTTTGTTCTGCAGATGATGAGCAACAAAAGGGTT
     Q  S  F  S  S  I  R  E  E  E  T  A  L  L  M  K  K  I  E  E  S  S  G  P  V  N  L  S  E
 436 CAATCTTTCAGTTCGATAAGGGAAGAAGAAACGGCCCTTCTCATGAAGAAGATTGAGGAATCTTCAGGGCCCGTGAATTTGAGTGAA
     M  V  A  E  V  N  G  D  A  I  F  R  S  T  F  G  R  K  Y  S  E  T  E  N  G  K  K  F  L
 523 ATGGTTGCCGAGGTGAATGGTGATGCGATTTTCAGATCAACTTTCGGCAGGAAATACAGTGAAACCGAAAATGGAAAGAAATTCCTG
     R  V  M  R  D  I  M  E  L  L  G  V  I  S  I  G  D  F  I  P  W  L  G  W  I  G  R  V  N
 610 CGTGTGATGAGGGATATCATGGAGCTTCTAGGGGTTATTAGCATCGGTGATTTTATTCCGTGGCTCGGTTGGATTGGTCGTGTTAAT
     G  F  D  K  R  L  D  Q  T  A  K  E  M  D  E  V  L  E  S  V  I  Q  E  R  L  Q  I  Q  E
 697 GGTTTCGATAAGAGACTCGATCAGACTGCGAAAGAGATGGATGAAGTTTTGGAGAGTGTGATTCAAGAACGCCTGCAGATTCAAGAG
     G  K  D  V  K  D  K  N  G  E  D  F  V  D  I  L  L  E  I  Y  S  D  E  T  A  D  A  S  I
 784 GGGAAGGATGTCAAGGACAAAAATGGAGAAGATTTTGTGGATATTTTGCTCGAAATCTACAGTGATGAAACTGCTGATGCCTCCATT
     D  R  D  C  V  K  A  L  L  L  D  V  F  I  G  G  T  D  T  I  S  T  S  L  D  W  V  M  S
 871 GATCGAGATTGCGTCAAAGCCTTACTTTTGGATGTATTTATTGGTGGAACTGATACAATTTCCACATCTTTGGACTGGGTGATGTCA
     E  L  L  R  H  P  T  V  M  E  K  L  Q  R  E  V  R  G  I  L  Q  Q  K  Q  H  I  T  Q  D
 958 GAACTCTTACGACATCCAACGGTAATGGAAAAGTTACAGCGCGAGGTCCGAGGCATCCTTCAACAGAAACAGCACATAACACAAGAT
     D  L  E  K  M  H  Y  M  K  A  V  I  K  E  T  M  R  L  H  P  P  F  P  L  L  G  A  R  V
1045 GATCTAGAAAAAATGCACTATATGAAGGCTGTGATCAAGGAAACCATGCGTTTGCACCCACCATTCCCATTGCTTGGAGCTAGAGTA
     A  S  K  D  V  Q  I  K  G  Y  D  V  A  A  G  T  I  V  M  I  N  A  W  A  M  G  R  D  L
1132 GCAAGCAAGGATGTGCAGATCAAAGGCTACGATGTTGCAGCTGGAACAATAGTGATGATCAACGCATGGGCCATGGGAAGGGACCTC
     I  L  W  D  E  P  E  N  F  T  P  D  R  F  W  N  S  S  I  D  F  K  G  I  D  F  E  L  I
1219 ATCTTATGGGACGAACCAGAAAACTTTACGCCGGACAGATTCTGGAATTCTTCGATAGATTTCAAAGGCATAGATTTCGAGTTGATC
     P  F  G  A  G  R  R  R  C  P  G  I  T  Y  A  T  A  T  M  E  L  V  L  A  N  L  V  Q  K
1306 CCGTTTGGGGCTGGACGAAGGAGATGCCCCGGGATCACATATGCTACTGCTACAATGGAGCTTGTGTTAGCGAATCTCGTGCAGAAA
     F  D  W  K  L  P  N  G  A  E  A  K  H  L  D  M  N  E  S  P  G  V  T  V  H  R  A  I  P
1393 TTCGACTGGAAATTGCCTAATGGGGCTGAGGCAAAACATTTGGACATGAATGAGAGCCCTGGAGTTACGGTCCATAGAGCTATTCCT
     L  L  A  V  A  S  R  S  K  *
1480 CTTCTTGCAGTTGCGTCTCGCTCCAAATAA
```

Слика П17. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP71AyR01* биљке *Rosmarinus officinalis*.

```
     M  E  L  V  Y  Q  I  I  S  S  C  L  V  I  V  L  L  S  Y  T  W  K  L  L  N  W  A  Y  L
   1 ATGGAACTAGTTTACCAAATAATATCTTCATGTTTAGTCATCGTTTTGTTGAGTTACACATGGAAATTACTGAATTGGGCATATTTG
     K  P  K  K  L  E  R  I  L  R  K  Q  G  L  K  G  N  S  Y  R  L  V  Y  G  D  L  Q  E  M
  88 AAGCCAAAGAAGCTGGAAAGGATCTTGAGGAAGCAGGGTTTGAAGGGGAATTCATACCGATTGGTCTATGGCGACTTGCAGGAGATG
     S  E  T  T  E  E  A  K  C  K  T  L  N  L  G  D  D  I  K  P  R  V  L  P  F  I  F  K  I
 175 TCGGAGACCACCGAAGAAGCCAAGTGCAAAACCCTCAATCTTGGCGATGATATCAAGCCAAGAGTCCTCCCTTTCATCTTCAAAATT
     I  Q  K  Y  G  N  E  S  F  L  W  M  G  P  K  P  A  I  N  I  T  D  V  E  L  I  K  E  V
 262 ATTCAGAAATACGGAAATGAGTCCTTTCTCTGGATGGGCCCGAAGCCGGCGATCAATATCACAGATGTTGAGCTCATCAAGGAAGTG
     F  A  K  Y  P  V  Y  Q  K  V  K  K  S  N  P  L  T  K  L  F  A  Q  G  L  T  T  F  E  K
 349 TTTGCGAAGTATCCGGTGTATCAGAAGGTGAAGAAATCGAATCCGCTGACGAAGCTGTTCGCGCAAGGACTGACGACCTTCGAGAAA
     D  K  W  A  K  Q  R  K  I  I  G  P  A  F  H  L  D  K  L  K  L  M  V  P  A  F  Y  L  S
 436 GACAAATGGGCCAAGCAAAGGAAAATCATTGGTCCTGCCTTCCACCTTGACAAATTGAAGCTGATGGTGCCTGCCTTCTACTTGAGC
     C  D  E  V  L  K  K  W  E  G  I  L  S  A  Q  G  S  C  E  V  D  V  W  P  Y  L  E  N  I
 523 TGTGATGAAGTTTTGAAGAAATGGGAGGGGATTCTGTCGGCGCAAGGGTCGTGTGAGGTGGATGTGTGGCCTTATCTAGAAAACATA
     T  S  D  A  I  S  R  T  A  F  G  S  S  Y  K  E  G  R  R  I  F  E  L  Q  I  E  Q  A  G
 610 ACCAGCGACGCCATATCAAGAACTGCATTTGGCAGTAGCTATAAAGAAGGGAGAAGAATCTTCGAGCTTCAGATCGAACAAGCTGGT
     H  V  I  K  T  L  Q  S  I  Y  I  P  G  S  R  Y  L  P  T  Q  R  N  K  R  M  K  E  I  E
 697 CATGTTATCAAAACTTTGCAGTCCATATATATTCCTGGATCTAGATATCTGCCAACCCAAAGGAACAAGAGAATGAAAGAAATCGAA
     R  E  V  Q  S  I  I  R  S  V  I  N  K  R  I  K  A  M  E  A  G  D  A  T  N  S  D  D  L
 784 AGGGAAGTCCAGTCAATAATCCGCAGTGTCATCAATAAAAGGATCAAGGCCATGGAAGCAGGGGACGCTACTAATAGTGACGACTTA
     L  G  I  L  L  K  S  N  F  K  E  I  E  Q  H  G  N  K  S  S  G  M  S  I  A  E  V  V  E
 871 TTAGGCATATTGCTGAAATCGAATTTCAAAGAAATCGAGCAACATGGCAACAAGAGCTCCGGAATGAGCATTGCTGAAGTAGTGGAA
     E  C  K  L  F  Y  F  A  G  Q  E  T  T  S  T  L  L  V  W  T  L  V  L  L  S  R  H  P  D
 958 GAGTGCAAACTGTTCTATTTCGCAGGGCAAGAGACTACTTCCACTTTGCTGGTGTGGACGTTGGTTTTATTGAGCAGGCATCCAGAT
     W  Q  T  R  A  R  E  E  V  L  R  V  F  G  N  Q  K  P  N  F  D  A  L  N  H  L  K  I  M
1045 TGGCAGACACGAGCCAGGGAAGAGGTTCTGCGAGTTTTCGGGAACCAAAAACCAAATTTCGACGCACTAAATCACCTCAAAATCATG
     N  M  I  L  H  E  V  L  R  L  Y  P  S  V  V  A  I  S  R  E  V  T  E  D  T  K  L  G  K
1132 AATATGATCTTGCACGAAGTTTTGAGGCTTTATCCATCAGTAGTGGCTATTAGTCGTGAAGTCACCGAGGACACAAAGTTGGGGAAA
     Y  M  L  P  A  G  V  R  V  F  L  P  M  I  M  L  H  H  D  H  E  I  W  G  D  D  A  L  E
1219 TATATGTTACCAGCTGGAGTTCGAGTCTTTCTGCCAATGATAATGCTACATCACGATCACGAAATTTGGGGTGACGACGCCTTGGAA
     F  N  P  E  R  F  S  Q  G  V  S  K  A  Q  K  R  Q  G  M  Y  F  P  F  G  W  G  P  R  I
1306 TTCAATCCGGAGAGATTCAGCCAAGGAGTTTCAAAGGCGCAGAAGAGGCAAGGTATGTATTTCCCCTTCGGATGGGGCCCTCGAATC
     C  I  G  Q  N  F  A  M  A  E  A  K  V  A  L  A  M  M  L  Q  R  F  S  F  E  L  S  P  S
1393 TGCATTGGCCAAAATTTCGCCATGGCAGAGGCCAAAGTGGCGCTGGCTATGATGCTGCAGCGCTTCTCCTTCGAGCTTTCGCCTTCG
     Y  T  H  A  P  F  A  T  V  T  T  R  P  Q  H  G  A  H  L  L  L  H  K  L  *
1480 TATACGCACGCTCCCTTCGCCACGGTCACCACTCGGCCTCAGCATGGTGCTCACTTGCTTCTGCACAAACTCTAG
```

Слика П18. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP72AxR02* биљке *Rosmarinus officinalis*.

```
     M  E  L  V  S  S  Q  I  I  A  A  A  A  A  A  A  A  A  F  V  L  V  V  K  L  L  N  W  A
   1 ATGGAAACTCGTATCATCCCAGATAATTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTTCGTGCTTGTGGTGAAATTACTGAACTGGGCA
     Y  L  R  P  K  R  L  E  K  A  L  R  K  Q  G  L  N  G  N  S  Y  K  L  V  I  G  D  L  K
  88 TACCTGCGGCCGAAGCGTCTGGAGAAAGCGCTGAGGAAGCAGGGACTGAATGGGAATTCCTACAAATTGGTGATTGGCGACTTGAAA
     E  F  M  K  A  M  E  E  A  K  L  K  H  I  N  L  D  D  D  I  K  T  R  V  V  P  F  F  V
 175 GAGTTCATGAAGGCCATGGAAGAAGCCAAGTTGAAGCACATCAATCTCGATGATGATATCAAGACAAGAGTCGTGCCCTTTTTCGTC
     N  T  L  S  K  F  G  N  D  S  F  F  W  F  G  P  N  P  T  L  I  V  T  N  P  D  I  A  K
 262 AATACACTCTCCAAATTTGGAAATGATTCGTTTTTCTGGTTTGGACCAAACCCTACACTCATCGTAACGAATCCGGATATAGCTAAA
     E  I  L  A  K  S  D  S  F  P  K  P  Q  S  S  N  P  L  P  R  L  L  V  K  G  V  V  S  Y
 349 GAGATTCTAGCCAAGTCCGATTCATTCCCAAAGCCGCAAAGCTCGAATCCGCTGCCTAGGCTGCTTGTCAAAGGAGTTGTGAGCTAC
     E  K  E  K  W  A  K  H  R  K  I  I  N  P  A  F  H  L  D  K  L  K  L  M  I  P  A  F  C
 436 GAGAAAGAGAAATGGGCCAAGCACAGGAAGATCATCAACCCTGCTTTCCATCTAGACAAACTCAAGCTAATGATACCTGCCTTCTGT
     L  S  C  D  E  V  L  R  E  W  E  K  S  L  S  P  E  G  C  C  E  V  D  V  W  P  Y  L  Q
 523 TTGAGCTGCGATGAAGTTCTGAGAGAATGGGAGAAGAGTCTTTCACCGGAAGGATGCTGTGAGGTGGACGTGTGGCCTTATTTGCAA
     N  L  T  S  D  A  I  S  R  T  A  F  G  S  S  Y  E  E  G  R  R  I  F  E  L  Q  S  E  Q
 610 AACCTAACGAGCGATGCAATATCAAGAACTGCATTCGGCAGCAGCTACGAAGAAGGTAGAAGAATATTCGAGCTGCAGAGCGAGCAG
     A  E  Y  A  M  Q  A  L  R  S  V  Y  I  P  G  W  R  Y  V  S  T  K  R  N  K  R  M  K  E
 697 GCTGAGTACGCCATGCAGGCGTTGCGCTCTGTATATATTCCAGGATGGAGATATGTATCCACAAAAAGGAACAAGAGAATGAAAGAA
     I  A  K  E  V  H  Y  I  I  R  Q  L  I  D  R  R  V  E  A  T  R  T  G  E  A  R  H  E  D
 784 ATTGCGAAAGAGGTTCACTACATAATCCGGCAGCTCATTGATAGAAGGGTTGAAGCGACGAGAACAGGGGAAGCCAGGCATGAGGAC
     L  L  S  I  L  L  A  S  N  L  Q  E  I  K  E  R  G  S  K  S  F  G  M  S  M  D  E  V  V
 871 TTGTTGAGCATATTGTTGGCGTCGAATTTGCAAGAAATCAAAGAGCGTGGTAGCAAGAGTTTCGGGATGAGCATGGACGAAGTAGTC
     E  E  C  K  L  F  Y  F  A  G  Q  E  T  T  S  S  L  L  V  W  A  M  V  L  L  S  R  Y  P
 958 GAAGAGTGCAAGCTCTTCTATTTTGCAGGGCAGGAGACGACTTCATCGCTGCTCGTGTGGGCTATGGTTTTATTGAGCAGATATCCG
     D  W  Q  T  S  A  R  E  E  V  L  Q  V  F  G  N  Q  T  P  H  F  D  G  L  N  Q  L  K  I
1045 GATTGGCAGACGAGTGCAAGGGAGGAGGTCTTGCAAGTCTTCGGCAATCAAACGCCACATTTCGATGGTCTCAATCAACTCAAGATT
     V  T  M  I  L  Y  E  V  L  R  L  Y  S  P  I  V  S  L  R  R  Q  V  S  K  E  S  K  V  G
1132 GTTACCATGATTCTGTACGAGGTTTTGAGGCTTTACTCGCCGATAGTTTCTCTGAGGCGGCAAGTGAGCAAGGAAAGCAAGGTGGGG
     E  L  T  L  P  A  G  V  H  F  L  V  P  I  I  S  L  H  H  D  R  E  I  W  G  D  D  A  L
1219 GAGCTCACGTTGCCGGCGGGAGTTCATTTCTTGGTGCCAATCATCTCGCTGCATCACGACCGTGAGATTTGGGGGGACGATGCATTG
     E  F  N  P  Q  R  F  S  E  G  V  L  K  A  Q  R  K  Q  G  V  F  F  P  F  G  W  G  P  R
1306 GAGTTCAATCCGCAGAGGTTCAGTGAAGGAGTGTTGAAGGCGCAGAGGAAGCAGGGTGTGTTCTTCCCGTTTGGGTGGGGGCCTCGC
     I  C  V  G  Q  T  F  A  M  L  E  A  K  V  A  L  A  L  I  L  Q  R  F  M  F  E  L  S  P
1393 ATCTGCGTAGGGCAGACGTTCGCGATGCTCGAGGCTAAAGTGGCGCTGGCTCTGATTCTCCAACGCTTCATGTTCGAGCTTTCGCCT
     S  Y  T  H  A  P  V  T  V  V  T  V  Q  P  Q  H  G  A  Y  L  L  L  H  K  L  *
1480 TCGTACACGCATGCTCCTGTCACAGTTGTTACGGTGCAGCCGCAGCATGGTGCTTATTTGCTTCTGCACAAGCTGTAG
```

Слика П19. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP72AxR04* биљке *Rosmarinus officinalis*.

```
     M  G  V  L  D  Y  P  E  L  L  V  L  L  L  I  P  V  M  A  Y  L  V  R  R  R  G  K  D  M
   1 ATGGGCGTGTTAGATTACCCAGAGCTACTTGTGCTGCTGCTAATCCCAGTGATGGCCTACTTGGTAAGGAGAAGGGGAAAAGATATG
     I  S  P  S  N  W  P  V  V  G  M  L  P  G  V  L  L  N  L  H  R  P  H  E  Y  L  T  Q  V
  88 ATTAGCCCCAGCAACTGGCCGGTGGTCGGAATGCTGCCGGGCGTCCTCCTCAACCTGCACCGCCCCCACGAATACCTGACCCAAGTC
     F  R  D  R  G  S  T  L  E  F  K  G  P  W  L  S  D  M  N  M  V  L  T  C  D  P  A  N  I
 175 TTCCGCGATCGCGGCAGCACCCTCGAATTCAAAGGCCCCTGGCTCTCCGACATGAACATGGTCCTCACCTGCGACCCCGCCAACATC
     H  H  V  F  S  R  N  F  S  N  Y  P  K  G  P  E  F  R  K  I  F  G  V  L  G  D  G  I  F
 262 CACCACGTCTTCAGCCGAAACTTCTCCAACTATCCAAAGGGCCCCGAATTCCGCAAGATCTTCGGGGTTCTGGGAGACGGAATATTT
     G  A  D  F  D  L  W  E  V  H  R  R  T  T  L  S  Q  L  S  H  A  S  F  A  A  H  L  E  A
 349 GGTGCCGATTTCGACCTCTGGGAGGTCCACCGCAGGACCACGCTGTCCCAGCTCAGCCACGCGTCCTTCGCCGCCCACCTCGAGGCT
     V  V  W  R  K  I  E  A  G  L  L  P  L  L  R  R  F  C  Q  E  G  R  D  F  D  L  Q  D  L
 436 GTCGTCTGGCGCAAGATCGAGGCCGGCCTCCTCCCCTTGCTCCGCCGCTTCTGCCAAGAGGGGCGCGACTTCGATTTGCAGGATCTT
     F  Q  R  L  T  F  D  N  I  C  K  L  V  L  D  Y  D  P  C  S  L  S  L  D  L  P  H  I  P
 523 TTCCAGCGGCTGACTTTCGACAACATCTGCAAGCTCGTGCTAGACTACGACCCCTGCAGTTTATCCCTCGATCTGCCGCACATCCCC
     C  E  K  A  F  S  A  V  G  E  P  L  M  Y  R  H  V  I  P  E  F  I  W  K  L  Q  G  R  L
 610 TGCGAGAAGGCGTTCAGCGCCGTCGGGGAGCCGCTCATGTACCGCCACGTCATCCCGGAGTTCATCTGGAAGCTGCAGGGCCGGCTC
     N  I  G  R  E  R  M  L  A  E  A  E  S  A  F  H  N  F  I  Y  P  R  V  D  P  E  E  K  N
 697 AACATCGGCAGGGAGAGGATGCTGGCGGAGGCGGAGAGTGCGTTTCACAACTTCATCTATCCGCGAGTGGATCCGGAGGAGAAGAAT
     E  F  N  M  L  R  A  F  E  K  M  Y  K  E  N  N  L  G  P  A  S  G  L  K  D  F  L  K  D
 784 GAGTTCAATATGCTGAGAGCTTTCGAGAAGATGTATAAGGAGAATAATCTGGGGCCGGCCTCTGGTCTGAAAGATTTCTTGAAGGAC
     T  S  L  S  L  I  F  A  G  R  D  T  T  S  T  S  L  T  W  L  F  W  L  I  A  Q  N  P  A
 871 ACGTCACTGAGCTTGATCTTCGCCGGGAGAGACACGACCAGCACCTCCCTCACCTGGCTCTTCTGGCTCATCGCTCAGAATCCGGCA
     T  E  R  K  I  R  E  E  I  E  T  E  L  D  L  K  E  D  K  K  W  R  F  F  T  A  R  E  S
 958 ACGGAGAGGAAGATCCGTGAGGAGATCGAGACGGAGTTGGATCTTAAAGAGGACAAGAAATGGAGATTCTTTACTGCACGGGAGTCG
     H  R  L  K  Y  L  H  G  A  L  C  E  S  L  R  L  F  P  P  V  A  M  E  H  K  A  P  M  R
1045 CACAGGCTGAAATATCTGCACGGCGCCCTGTGCGAGTCGCTGAGGCTGTTCCCGCCGGTGGCGATGGAGCACAAGGCCCCCATGCGG
     P  D  I  L  P  S  G  H  Y  L  R  E  N  S  K  L  I  V  C  F  Y  S  V  G  R  M  E  S  V
1132 CCGGATATTCTGCCAAGCGGGCACTACCTCCGGGAAAACTCGAAGCTCATAGTGTGCTTCTACTCGGTTGGGAGAATGGAGAGCGTG
     W  G  K  D  C  L  E  F  K  P  E  R  W  I  S  P  T  G  K  I  K  H  E  P  S  Y  K  F  P
1219 TGGGGGAAGGACTGCTTGGAGTTCAAACCGGAGAGGTGGATCTCGCCCACGGGGAAGATCAAGCACGAGCCGTCGTACAAGTTCCCG
     A  F  N  A  G  P  R  T  C  L  G  K  E  M  A  F  I  Q  M  K  M  V  A  A  T  I  I  Y  H
1306 GCGTTCAACGCCGGGCCGAGGACTTGCTTGGGGAAGGAGATGGCGTTCATACAGATGAAGATGGTGGCGGCGACGATTATATATCAT
     Y  S  V  K  L  V  E  G  H  Q  V  Y  P  R  D  S  I  I  L  Q  A  K  H  G  L  R  V  R  L
1393 TACAGTGTTAAATTGGTGGAGGGGCATCAAGTTTATCCTCGCGACTCCATTATTCTGCAGGCCAAGCATGGATTGAGAGTGAGGTTA
     C  R  I  N  S  S  T  Q  L  *
1480 TGCAGAATTAATTCCTCAACTCAACTGTAA
```

Слика П20. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP96xR01* биљке *Rosmarinus officinalis*.

```
     M  A  I  F  D  F  H  Y  E  F  V  L  L  I  P  P  L  F  L  A  W  Y  M  A  S  R  R  G  K
   1 ATGGCCATATTTGATTTCCACTACGAGTTTGTGTTGCTGATTCCTCCACTCTTTCTTGCCTGGTACATGGCAAGTAGAAGAGGCAAG
     K  P  P  E  P  T  M  W  P  V  L  G  M  L  P  A  V  L  L  N  L  R  R  V  H  D  Y  A  T
  88 AAACCCCCGGAGCCAACGATGTGGCCGGTGCTGGGGATGCTGCCGGCGGTTCTCCTGAATCTCCGCCGCGTACACGACTACGCGACG
     E  V  L  T  Q  C  G  G  T  Y  R  F  V  G  P  W  L  F  N  I  D  M  L  V  T  S  D  P  A
 175 GAGGTCCTAACGCAGTGCGGCGGCACGTACAGGTTCGTGGGGCCGTGGCTCTTCAACATCGACATGCTCGTCACCAGTGACCCCGCT
     N  I  H  H  V  L  S  R  N  F  S  N  Y  P  K  G  P  E  F  R  K  I  F  D  I  L  G  D  G
 262 AACATCCACCACGTCCTCAGCAGAAACTTCTCCAACTATCCAAAAGGCCCCGAATTCCGCAAGATCTTCGACATCTTGGGCGACGGC
     I  F  G  A  D  F  E  L  W  E  L  H  R  K  T  T  L  A  Q  L  T  H  A  D  F  N  A  Y  L
 349 ATCTTCGGCGCCGACTTCGAGCTCTGGGAGCTCCACCGCAAGACCACGCTCGCCCAGCTCACGCATGCCGATTTCAATGCCTACCTT
     H  R  T  V  W  H  K  V  E  T  G  L  F  P  V  L  D  H  F  C  G  A  G  T  H  L  D  L  Q
 436 CACAGGACCGTTTGGCACAAGGTCGAGACCGGTCTCTTTCCGGTTCTCGATCATTTCTGCGGAGCCGGAACCCATCTCGATTTGCAG
     D  I  F  Q  R  F  A  F  D  N  I  C  K  L  V  L  E  Y  D  P  C  S  L  R  V  E  L  P  F
 523 GATATTTTCCAGAGATTCGCTTTCGATAACATCTGCAAACTTGTTTTGGAATACGACCCCTGCAGTTTGCGAGTGGAGTTGCCTTTT
     L  P  C  E  K  A  F  S  T  I  A  E  P  L  L  R  R  H  I  L  P  E  W  M  W  R  L  Q  K
 610 CTTCCGTGTGAGAAGGCTTTCAGCACGATCGCGGAGCCGCTGCTGCGCCGGCATATATTGCCGGAGTGGATGTGGAGGCTGCAGAAA
     W  L  D  I  G  D  E  R  T  I  S  K  A  N  E  A  F  D  D  F  I  Y  P  K  V  S  S  G  S
 697 TGGCTCGATATCGGTGACGAGAGGACCATCAGTAAGGCTAACGAGGCGTTCGACGATTTCATCTACCCAAAAGTCAGCTCCGGGAGC
     G  E  N  T  N  N  I  N  V  L  K  A  F  E  K  V  Y  R  E  R  N  I  A  S  S  N  G  L  K
 784 GGAGAGAATACTAATAATATAAATGTTTTGAAAGCGTTCGAGAAGGTTTACAGAGAGAGAAACATTGCTTCTTCAAACGGTTTGAAA
     D  F  L  K  D  T  S  L  N  L  M  F  A  G  R  D  T  T  S  T  C  L  T  W  L  F  W  L  V
 871 GATTTCCTCAAGGATACTTCGTTGAATTTGATGTTCGCCGGGAGAGACACGACGAGCACTTGTCTCACGTGGCTCTTCTGGCTCGTC
     G  Q  N  P  R  S  E  T  K  I  L  E  E  L  E  A  E  L  C  L  K  R  K  W  R  T  F  T  A
 958 GGGCAGAACCCTAGGTCTGAAACGAAGATCCTAGAAGAACTGGAAGCGGAGCTTTGTTTGAAGAGAAAATGGAGGACGTTCACAGCT
     E  E  S  Q  R  L  V  Y  L  H  G  A  L  C  E  S  L  R  L  Y  P  P  V  A  L  E  H  K  A
1045 GAGGAGTCGCAAAGGCTAGTGTACTTGCACGGAGCTCTCTGCGAGTCGCTGAGGCTATACCCGCCGGTGGCGCTGGAGCACAAGGCT
     P  V  R  P  D  V  L  P  S  G  H  E  L  Q  R  N  G  K  L  I  I  S  F  Y  S  V  G  R  M
1132 CCGGTGCGGCCGGATGTTCTTCCGAGCGGGCATGAGCTCCAGCGTAACGGAAAGCTGATAATATCATTCTACTCGGTGGGGAGAATG
     E  S  V  W  G  K  D  C  L  E  F  K  P  E  R  W  I  S  P  T  G  K  L  K  H  E  P  S  Y
1219 GAGAGCGTGTGGGGGAAGGACTGCTTGGAGTTCAAGCCGGAGAGGTGGATCTCGCCCACCGGGAAGCTTAAGCACGAGCCGTCCTAT
     K  F  P  A  F  N  A  G  P  R  T  C  L  G  K  E  M  A  F  V  Q  M  K  M  V  V  A  A  I
1306 AAGTTTCCGGCGTTCAACGCGGGGCCCAGGACTTGCTTGGGGAAGGAGATGGCGTTTGTGCAGATGAAGATGGTGGTGGCGGCGATA
     V  Y  G  Y  K  V  R  V  V  E  G  Q  V  V  S  P  R  D  S  I  I  L  Q  A  R  D  G  L  K
1393 GTGTACGGGTACAAGGTGAGGGTGGTGGAGGGGCAGGTGGTTTCTCCTCGGGACTCGATCATACTTCAGGCCAGAGATGGATTGAAG
     V  A  L  S  K  R  D  Y  *
1480 GTGGCGTTATCTAAGAGAGACTACTGA
```

Слика П21. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP96xR02* биљке *Rosmarinus officinalis*.

```
     M  F  M  E  I  L  Y  S  I  L  A  L  F  S  A  V  F  L  S  H  N  A  W  R  F  L  K  R  F
   1 ATGTTTATGGAAATATTATACAGCATACTTGCGCTATTTAGTGCTGTTTTTCTCTCACATAATGCATGGAGATTCTTGAAGAGGTTT
     W  F  E  P  R  K  V  E  Q  R  L  R  E  Q  G  F  R  G  N  S  Y  R  F  M  I  G  D  S  K
  88 TGGTTTGAGCCAAGAAAGGTGGAACAACGCCTGAGGGAACAAGGTTTCCGTGGAAACAGCTACAGATTTATGATCGGAGACTCCAAA
     E  L  A  M  K  A  K  E  A  R  S  K  P  I  S  F  S  N  D  I  A  P  R  V  I  P  F  I  H
 175 GAACTCGCCATGAAGGCCAAAGAAGCTCGTTCCAAACCTATCAGTTTTTCCAACGATATAGCGCCTCGAGTCATCCCCTTTATTCAT
     Q  S  L  L  K  Y  G  E  N  C  F  I  W  F  G  S  T  P  A  I  L  I  S  D  H  E  M  I  K
 262 CAATCCCTTCTCAAATACGGTGAAAACTGTTTCATATGGTTTGGCTCAACGCCTGCAATACTTATCTCCGATCACGAAATGATCAAA
     E  I  L  S  K  N  Y  V  F  Q  K  L  S  N  P  L  N  K  L  L  A  Q  G  V  A  V  Y  D  A
 349 GAAATTCTGTCGAAGAATTATGTTTTTCAGAAGCTTTCTAATCCCTTAAATAAGCTGCTAGCACAAGGCGTTGCAGTGTACGACGCA
     D  K  W  A  K  H  R  R  L  L  N  P  A  F  H  L  E  K  L  K  L  M  L  P  S  F  Y  L  S
 436 GATAAATGGGCCAAGCATAGAAGACTGCTGAATCCTGCTTTTCACCTTGAGAAATTGAAGCTTATGCTTCCATCGTTTTACTTGAGC
     C  A  D  M  L  S  K  L  E  K  M  I  P  S  D  G  A  C  E  V  D  V  W  P  H  L  Q  A  L
 523 TGTGCTGACATGTTGAGCAAATTGGAAAAGATGATACCAAGTGATGGAGCATGTGAAGTGGATGTGTGGCCTCATCTTCAAGCCCTA
     T  S  D  A  I  S  R  T  A  F  G  S  N  Y  E  E  G  R  K  I  F  E  L  Q  K  E  Q  G  L
 610 ACCAGCGATGCCATCTCGCGCACTGCGTTTGGCAGCAACTACGAAGAAGGTAGAAAGATATTCGAGCTTCAAAAAGAGCAAGGCTTG
     L  L  L  K  A  V  Q  T  L  Y  I  P  G  W  R  F  L  P  T  K  I  N  R  R  M  K  E  I  A
 697 CTCTTATTGAAGGCAGTTCAAACACTTTACATTCCTGGTTGGAGATTTCTGCCAACGAAAATAAACAGAAGGATGAAAGAAATAGCC
     K  E  V  D  S  L  I  L  G  I  I  N  K  R  M  Q  M  I  E  A  G  E  T  E  S  N  D  L  L
 784 AAGGAAGTGGACTCATTAATACTAGGCATCATAAATAAAAGAATGCAGATGATTGAAGCAGGGGAAACAGAGTCCAATGACTTACTA
     G  I  L  L  E  S  N  T  K  E  I  Q  Q  N  G  E  E  L  G  M  S  L  R  E  V  I  D  E  C
 871 GGAATATTGTTGGAGTCCAATACCAAGGAAATCCAACAGAATGGTGAAGAGTTGGGAATGAGCTTGCGCGAGGTTATCGATGAGTGC
     K  L  F  Y  M  A  G  Q  E  T  T  S  T  L  L  V  W  T  M  I  L  L  S  K  H  P  D  W  Q
 958 AAACTCTTTTACATGGCCGGACAGGAAACAACATCGACCTTGCTCGTGTGGACCATGATTCTGTTGAGCAAGCATCCCGACTGGCAG
     A  R  A  R  D  E  V  L  Q  V  L  V  S  D  K  P  D  F  Q  E  L  N  H  L  Q  V  V  T  M
1045 GCTCGCGCCAGAGACGAGGTTCTGCAAGTTCTTGTGAGTGATAAACCGGATTTCCAAGAGCTGAATCACCTGCAGGTTGTGACAATG
     I  F  H  E  V  L  R  L  Y  P  A  A  V  M  L  S  R  T  I  H  K  E  T  R  V  G  N  V  T
1132 ATTTTTCACGAGGTTCTGAGATTGTATCCAGCAGCAGTTATGCTAAGTCGAACTATTCATAAGGAAACTAGGGTAGGGAATGTAACA
     L  P  A  G  V  Q  L  F  L  A  T  L  V  V  Q  H  D  C  K  I  W  G  D  D  A  K  E  F  N
1219 CTTCCTGCTGGAGTGCAGCTCTTCCTAGCTACACTTGTAGTGCAACATGATTGCAAGATATGGGGAGATGATGCAAAAGAATTTAAT
     P  E  R  F  S  E  G  V  S  K  A  T  R  G  K  F  V  Y  L  P  F  G  G  G  P  R  I  C  I
1306 CCGGAGAGGTTTAGTGAAGGCGTGTCTAAGGCAACAAGAGGGAAGTTCGTGTATCTTCCATTTGGTGGAGGCCCTCGAATATGTATT
     G  Q  N  F  A  M  L  E  A  K  M  A  L  A  L  I  L  K  H  Y  W  F  E  L  S  P  S  Y  A
1393 GGACAGAATTTCGCAATGCTAGAAGCAAAAATGGCACTGGCCCTCATTTTAAAGCATTATTGGTTCGAGCTTTCTCCATCGTATGCA
     H  A  P  D  M  V  L  T  L  Q  P  Q  F  G  A  P  L  I  M  H  R  L  H  *
1480 CACGCACCGGATATGGTATTGACACTACAACCTCAATTTGGTGCGCCGTTGATCATGCACAGACTCCATTAG
```

Слика П22. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP72xR01* биљке *Rosmarinus officinalis*.

```
     M  D  S  F  P  L  L  A  A  L  F  F  I  L  A  A  T  W  F  I  S  F  R  R  P  R  N  L  P
   1 ATGGATTCTTTTCCTCTTCTCGCTGCGCTCTTCTTCATCCTCGCTGCGACATGGTTCATTTCCTTCCGGCGCCCGAGGAACCTCCCC
     P  G  P  F  P  Y  P  I  V  G  N  M  L  Q  L  G  T  Q  P  H  E  T  F  A  K  L  S  K  K
  88 CCGGGGCCTTTCCCCTATCCGATCGTCGGAAACATGCTGCAGCTCGGCACGCAACCCCACGAGACATTCGCCAAACTCTCCAAGAAA
     Y  G  P  L  M  S  I  H  L  G  S  L  Y  T  V  I  V  S  S  P  E  M  A  K  E  I  M  H  K
 175 TACGGCCCTCTCATGTCAATCCACCTCGGCAGCCTATACACCGTCATCGTCTCCTCCCCCGAGATGGCCAAAGAAATCATGCACAAA
     Y  G  Q  V  F  S  G  R  T  V  A  Q  A  V  H  A  C  G  H  D  K  I  S  M  G  F  L  P  V
 262 TACGGGCAAGTCTTCTCCGGCAGAACCGTAGCGCAGGCGGTCCACGCGTGCGGCCACGACAAGATCTCGATGGGGTTCCTCCCCGTG
     G  G  E  W  R  D  M  R  K  I  C  K  E  Q  M  F  S  H  Q  S  M  E  D  S  Q  W  L  R  K
 349 GGGGGCGAGTGGCGCGACATGCGCAAGATATGCAAAGAACAGATGTTCTCGCATCAGAGCATGGAAGACAGCCAGTGGCTCCGCAAG
     Q  K  L  Q  Q  L  L  E  Y  A  Q  K  C  S  E  R  G  R  A  I  D  I  R  E  A  A  F  I  T
 436 CAGAAGCTGCAGCAGCTGCTCGAATACGCCCAGAAATGCTCCGAGCGCGGCCGGGCAATCGATATCCGTGAGGCCGCCTTCATCACC
     T  L  N  L  M  S  A  T  L  F  S  M  Q  A  T  E  F  D  S  K  V  T  M  E  F  K  E  I  I
 523 ACGCTCAACCTCATGTCTGCCACTCTCTTCTCCATGCAGGCGACTGAATTCGACTCCAAAGTCACCATGGAATTCAAGGAGATCATC
     E  G  V  A  S  I  V  G  V  P  N  F  A  D  Y  F  P  I  L  R  P  F  D  P  Q  G  V  K  R
 610 GAGGGTGTGGCCAGCATCGTTGGCGTGCCCAACTTCGCCGATTACTTCCCCATCCTGAGGCCGTTCGACCCCCAGGGGGTGAAGCGC
     R  A  D  V  Y  F  G  R  L  L  A  I  I  E  G  F  L  N  E  R  V  E  S  R  R  T  N  P  N
 697 AGGGCGGATGTTTACTTCGGCAGATTGCTGGCCATAATCGAGGGATTTCTCAACGAAAGAGTCGAATCCAGACGGACCAATCCGAAT
     A  P  K  K  D  D  F  L  E  T  L  V  D  T  L  Q  T  N  D  N  K  L  K  T  D  H  L  T  H
 784 GCTCCTAAGAAGGATGACTTTCTCGAAACGCTTGTGGATACCCTTCAGACGAACGACAACAAGTTGAAGACCGATCACCTCACACAT
     L  M  L  D  L  F  V  G  G  S  E  T  S  T  T  E  I  E  W  I  M  W  E  L  L  A  N  P  E
 871 CTCATGCTGGACTTGTTTGTTGGAGGATCTGAAACAAGCACGACAGAGATCGAGTGGATAATGTGGGAGTTACTCGCTAACCCGGAG
     K  M  A  K  M  K  A  E  L  K  S  V  M  G  E  E  K  V  V  D  E  S  Q  M  P  R  L  P  Y
 958 AAGATGGCGAAGATGAAAGCAGAGCTGAAGAGCGTGATGGGAGAGGAGAAAGTAGTGGACGAGTCGCAGATGCCGAGGCTGCCATAT
     L  Q  A  V  V  K  E  S  M  R  L  H  P  P  G  P  L  L  L  P  R  K  A  E  S  D  Q  V  V
1045 CTGCAAGCAGTGGTGAAGGAATCGATGCGGCTCCACCCGCCGGGCCCTCTGCTTCTTCCTCGCAAAGCAGAGAGCGATCAGGTGGTG
     N  G  Y  L  I  P  K  G  A  Q  V  L  I  N  A  W  A  I  G  R  D  H  S  I  W  K  N  P  D
1132 AACGGCTACCTCATCCCCAAGGGAGCTCAGGTGCTGATCAACGCGTGGGCTATAGGCAGGGACCACAGCATCTGGAAGAATCCGGAC
     S  F  E  P  E  R  F  L  D  Q  K  I  D  F  K  G  T  D  Y  E  L  I  P  F  G  S  G  R  R
1219 TCCTTTGAGCCTGAACGCTTCCTCGATCAGAAGATAGACTTCAAGGGCACGGATTACGAGCTCATCCCCTTCGGGTCGGGTAGAAGG
     V  C  P  G  M  P  L  A  N  R  I  L  H  T  V  T  A  T  L  V  H  N  F  D  W  K  L  E  R
1306 GTCTGTCCGGGTATGCCGTTGGCCAACCGGATTCTGCATACGGTCACCGCCACTCTGGTTCACAACTTCGATTGGAAGCTCGAACGG
     P  E  A  S  D  A  H  R  G  V  L  F  G  F  A  V  R  R  A  V  P  L  K  I  V  P  F  K  V
1393 CCTGAAGCAAGTGATGCGCACCGTGGTGTGTTGTTTGGCTTTGCGGTGCGGAGGGCGGTTCCACTCAAGATCGTTCCGTTTAAGGTA
     *
1480 TAA
```

Слика П23. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP76AAxR03 (RoFS1)* биљке *Rosmarinus officinalis*.

```
     M  D  S  F  P  L  L  A  T  L  F  F  I  L  A  A  T  W  F  I  S  F  R  R  R  R  N  L  P
   1 ATGGATTCTTTTCCTCTTCTCGCTACCCTCTTCTTCATCCTCGCTGCGACATGGTTCATTTCCTTCCGGCGCCGGAGGAATCTTCCT
     P  G  P  F  P  Y  P  I  V  G  N  M  L  Q  L  G  S  Q  P  H  E  T  F  A  K  L  S  K  K
  88 CCCGGGCCTTTCCCCTATCCGATTGTAGGCAACATGCTGCAGCTCGGCTCCCAACCCCACGAGACATTCGCCAAACTCTCCAAGAAA
     Y  G  P  L  M  S  I  H  L  G  S  L  Y  T  V  I  V  S  S  P  E  M  A  K  E  I  M  H  K
 175 TACGGCCCTCTCATGTCAATCCACCTCGGCAGCCTATACACCGTCATCGTCTCCTCACCGGAGATGGCGAAAGAAATCATGCACAAA
     Y  G  Q  V  F  S  G  R  T  V  A  Q  A  V  H  A  C  G  H  D  K  I  S  M  G  F  L  P  V
 262 TACGGGCAAGTCTTCTCCGGCCGCACCGTCGCGCAGGCCGTCCACGCGTGCGGCCACGACAAGATCTCGATGGGGTTCCTCCCCGTG
     G  G  E  W  R  D  M  R  K  I  C  K  E  Q  M  F  S  H  Q  S  M  E  D  S  Q  G  L  R  K
 349 GGGGGCGAGTGGCGCGACATGCGCAAGATATGCAAAGAGCAGATGTTCTCGCATCAGAGCATGGAAGACAGTCAGGGGCTCCGCAAG
     Q  K  L  Q  Q  L  L  D  Y  A  Q  K  C  S  E  R  G  R  A  I  D  I  R  E  A  A  F  I  T
 436 CAGAAGCTGCAGCAGCTGCTCGACTACGCCCAGAAATGCTCCGAGCGCGGCCGAGCGATAGATATCCGTGAGGCTGCCTTTATCACC
     T  L  N  L  M  S  A  T  L  F  S  M  Q  A  T  E  F  D  S  K  V  T  M  E  F  K  E  I  I
 523 ACGCTCAACCTCATGTCCGCGACTCTCTTCTCCATGCAGGCGACTGAGTTCGACTCCAAAGTCACCATGGAATTCAAGGAGATCATC
     E  G  V  A  S  I  V  G  V  P  N  F  A  D  Y  F  P  I  L  R  P  F  D  P  Q  G  V  K  R
 610 GAGGGCGTGGCCAGCATTGTTGGCGTGCCCAACTTCGCCGACTACTTCCCCATCCTGAGGCCGTTCGATCCGCAGGGGGTGAAGCGC
     R  A  D  V  Y  F  G  R  L  L  A  M  I  E  G  F  L  N  E  R  V  E  S  R  R  T  N  P  N
 697 AGGGCGGATGTTTACTTCGGCAGATTGCTGGCCATGATCGAGGGATTTCTCAACGAAAGAGTTGAGTCGAGACGGACGAATCCCAAT
     A  P  K  K  D  D  F  L  E  T  L  V  D  I  L  E  A  N  D  C  K  L  K  T  D  H  L  T  H
 784 GCTCCGAAGAAGGATGACTTTCTTGAAACGTTAGTGGATATTCTTGAGGCCAACGACTGTAAGTTGAAGACGGATCACCTCACGCAT
     L  M  L  D  L  F  V  G  G  S  E  T  S  T  T  E  I  E  W  I  M  W  E  L  I  A  H  P  D
 871 CTCATGCTGGACTTGTTTGTTGGAGGATCAGAAACAAGCACGACCGAGATCGAGTGGATAATGTGGGAGTTAATTGCGCACCCAGAC
     K  M  V  K  V  K  A  E  L  K  S  V  M  G  E  E  K  V  V  D  E  S  N  M  P  R  L  P  Y
 958 AAAATGGTGAAGGTGAAAGCGGAGCTGAAGAGCGTGATGGGAGAGGAGAAGGTGGTGGACGAATCAAACATGCCGAGGCTGCCGTAT
     L  Q  A  V  V  K  E  S  M  R  L  H  P  P  G  P  L  L  L  P  R  K  A  E  S  D  Q  V  V
1045 CTGCAAGCAGTGGTGAAGGAATCGATGCGGCTCCACCCGCCGGGCCCACTGCTCCTTCCTCGCAAAGCGGAGAGCGATCAGGTGGTG
     N  G  Y  L  I  P  K  G  T  Q  V  L  I  N  A  W  A  M  G  R  D  P  S  I  W  K  N  P  D
1132 AACGGCTACCTCATCCCGAAGGGGACTCAGGTGCTGATCAACGCGTGGGCTATGGGCAGGGACCCCAGCATCTGGAAGAATCCTGAT
     S  F  E  P  E  R  F  L  D  Q  K  I  D  F  K  G  Q  D  Y  E  L  I  P  F  G  S  G  R  R
1219 TCCTTTGAGCCGGAGCGCTTCCTGGATCAGAAGATAGACTTCAAAGGCCAGGATTACGAGCTCATCCCCTTCGGCTCAGGTAGAAGG
     V  C  P  G  M  P  L  A  N  R  I  L  H  T  V  T  A  T  L  V  H  N  F  H  W  E  L  E  R
1306 GTCTGTCCGGGCATGCCGTTGGCCAACCGGATTCTGCATACGGTCACGGCCACTCTCGTTCACAACTTCCATTGGGAACTCGAACGC
     P  D  A  S  H  A  E  H  Q  G  V  L  F  G  F  A  V  R  R  A  V  P  L  K  I  V  P  F  K
1393 CCGGACGCAAGTCATGCGGAGCACCAGGGTGTGTTGTTTGGCTTTGCGGTGCGAAGGGCGGTTCCGCTCAAGATAGTTCCCTTTAAG
     A  *
1480 GCATAA
```

Слика П24. Нуклеотидна и аминокиселинска секвенца цДНК гена *CYP76AAxR04 (RoFS2)* биљке *Rosmarinus officinalis*.

Табела П1. Протеинске секвенце коришћене за филогенетске анализе цитохром P450 кандидата и њихови приступни бројеви.

Скраћени називи протеина	Врста	функција	Приступни бројеви
AbCAS	*Abies balsamea*	*cis*-абиенол-синтаза	AEL99953.1
AgAS	*Abies grandis*	абиетадиен-синтаза	Q38710.1
AtCPS	*Arabidopsis thaliana*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	NP_192187.1
AtKS	*Arabidopsis thaliana*	*ent*-каурен-синтаза	AAC39443.1
CcCLS	*Cistus creticus*	копал-8-ол дифосфат synthase	ADJ93862.1
CaCPS	*Coffea arabica*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	ACQ99373.1
CaKS	*Coffea arabica*	*ent*-каурен-синтаза	ACQ99376.1
CsCPS	*Croton sublyratus*	копалил дифосфат-синтаза	BAA95612.1
CsKS	*Cucumis sativus*	*ent*-каурен-синтаза	BAB19275.1
CmCPS1	*Cucurbita maxima*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза 1	AAD04293.1
CmCPS2	*Cucurbita maxima*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза 2	AAD04292.1
CmKS	*Cucurbita maxima*	*ent*-каурен-синтаза	Q39548.1
GbLS	*Ginkgo biloba*	левопимарадиен синтаза	AAL09965.1
HaCPS	*Helianthus annuus*	копалил дифосфат-синтаза	CBL42915.1
HaKS	*Helianthus annuus*	каурен-синтаза	CBL42917.1
HvCPS	*Hordeum vulgare*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	AAT49065.1
HvKSL1	*Hordeum vulgare*	*ent*-каурен-синтаза	AAT49066.1
JsCPS/KS	*Jungermannia subulata*	*ent*-каурен-синтаза	BAJ39816.1
NtCPS2	*Nicotiana tabacum*	8-хидрокси-копалил дифосфат-синтаза	CCD33018.1
NtABS	*Nicotiana tabacum*	*cis*-абиенол синтаза	CCD33019.1
OsCPS	*Oryza sativa japonica*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	NP_001046550.1
OsKSL7	*Oryza sativa japonica*	*ent*-каса-12,15-диен синтаза	Q00G37.2
OsKS1	*Oryza sativa japonica*	*ent*-каурен-синтаза	BAE72099.1
OsKSL10	*Oryza sativa japonica*	*Ent*-сандаракопимарадиен синтаза	Q2QQJ5.2
OsKSL6	*Oryza sativa japonica*	*iso*-каурен-синтаза	ABH10733.1
OsSynCPS	*Oryza sativa japonica*	*syn*-копалил дифосфат-синтаза	NP_001052171.1
PpCPS/KS	*Physcomitrella patens*	*ent*-каурен-синтаза	BAF61135.1
PaIS	*Picea abies*	изопимарадиен синтаза	AAS47690.2
PaLAS	*Picea abies*	левопимарадиен синтаза	AAS47691.1
PgCPS	*Picea glauca*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	ADB55707.1
PgKS	*Picea glauca*	*ent*-каурен-синтаза	ACY25275.1
PsiCPS	*Picea sitchensis*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	ADB55709.1
PsiKS	*Picea sitchensis*	*ent*-каурен-синтаза	ADB55710.1
PsCPS	*Pisum sativum*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	O04408.1
PtKS	*Populus trichocarpa*	*ent*-каурен-синтаза	XP_002311286.1
RcKS	*Ricinus communis*	*ent*-каурен-синтаза (потенцијална)	XP_002533694.1
RcKSL1	*Ricinus communis*	*ent*-каурен-синтаза (потенцијална)	XP_002525841.1
RcKSL2	*Ricinus communis*	*ent*-каурен-синтаза (потенцијална)	XP_002525836.1
RcKSL3	*Ricinus communis*	*ent*-каурен-синтаза (потенцијална)	XP_002525842.1
SmCPS	*Salvia miltiorrhiza*	копалил дифосфат-синтаза	ABV57835.1
SmKSL	*Salvia miltiorrhiza*	каурен-синтаза	ABV08817.1
SsLPPS	*Salvia sclarea*	лабд-13-ен-8-ол дифосфат синтаза	AFU61897.1
SsSS	*Salvia sclarea*	склареол синтаза	AFU61898.1
SdCPS	*Scoparia dulcis*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	BAB03594.1
SdKS	*Scoparia dulcis*	*ent*-каурен-синтаза	AEF33360.1
SmCPS/KS1	*Selaginella moellendorffii*	лабда-7,13*E*-диен-15-ол синтаза	AEK75338.1
ShSBS	*Solanum habrochaites*	Сантален и бергамотен синтаза	B8XA41.1
SlCPS	*Solanum lycopersicum*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	NP_001234008.1

SlKS	*Solanum lycopersicum*	*ent*-каурен-синтаза	AEP82778.1
SlPHS	*Solanum lycopersicum*	феландрен синтаза	NP_001234629.1
SrCPS	*Stevia rebaudiana*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	AAB87091.1
SrKS1	*Stevia rebaudiana*	каурен-синтаза	AAD3425.1
SrKS2	*Stevia rebaudiana*	каурен-синтаза	AAD3424.1
TcTS	*Taxus canadensis*	такса-4(5),11(12)-диен синтаза	AAR13860.1
TaKSL5	*Triticum aestivum*	неролидол синтаза	BAL41692.1
VvKS1	*Vitis vinifera*	*ent*-каур-16-ен синтаза (потенцијална)	XP_002265005.2
ZmTPS1	*Zea mays*	синтаза ацикличних сесквитерпена	NP_001105097.1
ZmCPS	*Zea mays*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза	NP_001105329.1
ZmCPS2	*Zea mays*	*ent*-копалил дифосфат-синтаза 2	AAT70083.1

Табела П2. Протеинске секвенце коришћене за филогенетске анализе ензима SfCPS и SfKSL и њихови приступни бројеви.

Скраћени називи протеина	**Врста**	**Приступни бројеви**
AtCYP85A1	*Arabidopsis thaliana*	AB035868
AtCYP88A3	*Arabidopsis thaliana*	AC000098
AtCYP96A15	*Arabidopsis thaliana*	AY090941
CaCYP76B4	*Camptotheca acuminata*	AES93118
CiCYP71AV8	*Cichorium intybus*	ADM86719
CrCYP76B6	*Catharanthus roseus*	AJ251269
ElCYP726A1	*Euphorbia lagascae*	AAL62063
GaCYP706B1	*Gossypium arboreum*	AAK60517
GmCYP71D9	*Glycine max*	Y10490
GmCYP93E1	*Glycine max*	AB231332
GuCYP72A154	*Glycine max*	AB558153
GuCYP88D6	*Glycyrrhiza uralensis*	AB433179
HtCYP76B1	*Helianthus tuberosus*	Y09920,Y10098
MpCYP71A32	*Mentha x piperita*	Q947B7
MpCYP71D13	*Mentha x piperita*	AY281027
MsCYP71D18	*Mentha spicata*	AF124815
MtCYP716A12	*Medicago truncatula*	FN995112
NtCYP71D16	*Nicotiana tabacum*	AF166332
NtCYP71D20	*Nicotiana tabacum*	AF368376
OsCYP76M7	*Oryza sativa*	AK105913
PaCYP71A1	*Persea americana*	P24465
PgCYP716A53v2	*Panax ginseng*	JX036031
PhCYP76A4	*Petunia hybrida*	AB016061
PsCYP720B4	*Pisum sativum*	HM245403
SaCYP76F37v1	*Santalum album*	KC533717
SaCYP76F38v1	*Santalum album*	KC533715
SaCYP76F39v1	*Santalum album*	KC533716
SbCYP51	*Sorghum bicolor*	U74319
SmCYP76B10	*Swertia mussotii*	GU168041
SmCYP76B4	*Swertia mussotii*	D1MI46
VvCYP716A15	*Vitis vinifera*	AB619802

Биографија аутора

Драгана Божић је рођена 10. октобра 1978. године у Београду. Основну и средњу школу је завршила у Београду. Биолошки факултет Универзитета у Београду је уписала школске 1997/1998. године. Факултет је завршила 2005. године. Школске 2006/2007. уписала је докторске студије на смеру Физиологија биљака и молекуларна биологија Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Од фебруара 2007. године ради као истраживач приправник у Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду. У звање истраживач сарадник изабрана је фебруара 2010. године.

Од септембра 2009. године, до марта 2013. године, Драгана Божић је била на научном усавршавању у Лабораторији за фармакогнозију Фармацеутског факултета Аристотеловог универзитета у Солуну, Грчка.

Тренутно је Драгана Божић ангажована на националном пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја републике Србије из програма основних истраживања под насловом: „Физиолошка, хемијска и молекуларна анализа диверзитета ретких и угрожених биљних врста у циљу *ex situ* заштите и продукције биолошки активних једињења“ (ОИ173024). У периоду 2006-2010. године Драгана Божић је била ангажована на националном пројекту „Светлосна и хормонална контрола растења и развића биљака, размножавање *in vitro* и *ex situ* заштита ретких и угрожених врста“ (143031Б). У предходном периоду Драгана Божић је била ангажована и на једном међународном пројекту„*Plant Terpenoids for Human Health: a chemical and genomic approach to identify and produce bioactive compounds“*(*FP7* пројекат, бр. 227448).

Драгана Божић је члан Друштва за физиологију биљака Србије и међународне организације *FESPB* (*Federation of European Societies of Plant Biology*).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Драгана Божић

број уписа ЕА060003

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Изолација и функционална карактеризација гена укључених у синтезу карнозинске киселине

- 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, 25.02.2014.

Драгана Божић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драгана Божић

Број уписа ЕА060003

Студијски програм Експериментална и примењена ботаника

Наслов рада Изолација и функционална карактеризација гена укључених у синтезу карнозинске киселине

Ментор др Анета Сабовљевић

Потписани Драгана Божић

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, 25.02.2014.

Драгана Божић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Изолација и функционална карактеризација гена укључених у синтезу карнозинске киселине

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 одлучио/ла.

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, 25.02.2014.

Драгана Ћут

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.