



UNIVERZITET U
KRAJUJEVCU
AGRONOMSKI FAKULTET U
ČAČKU



UNIVERSITY OF
KRAJUJEVAC
FACULTY OF
AGRONOMY
ČAČAK

XXVI SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- ZBORNİK RADOVA -



Čačak, 12 - 13. mart 2021. godine

XXVI SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- Zbornik radova -

ORGANIZATOR I IZDAVAČ

**Univerzitet u Kragujevcu,
Agronomski fakultet u Čačku**

Organizacioni odbor

Prof. dr Milun Petrović, prof. dr Ljiljana Bošković-Rakočević, dr Duško Brković, spec. dr vet. med Miloš Petrović, dipl. inž. Miloš Marjanović

Programski odbor

Dr Vladimir Kurćubić, vanredni profesor, prof. dr Tomo Milošević, prof. dr Snežana Bogosavljević-Bošković, prof. dr Radojica Đoković, prof. dr Goran Dugalić, prof. dr Biljana Veljković, prof. dr Milena Đurić, prof. dr Milomirka Madić, prof. dr Leka Mandić, prof. dr Drago Milošević, prof. dr Aleksandar Paunović, prof. dr Lenka Ribić-Zelenović, prof. dr Vladeta Stevović, prof. dr Gordana Šekularac, dr Goran Marković, vanredni profesor, dr Pavle Mašković, vanredni profesor, dr Gorica Paunović, vanredni profesor, dr Snežana Tanasković, vanredni profesor, dr Mlađan Garić, vanredni profesor, dr Tomislav Trišović, vanredni profesor, dr Jelena Mašković, vanredni profesor, dr Jelena Mladenović, vanredni profesor, dr Vladimir Dusković, vanredni profesor, dr Ivan Glišić, docent, dr Dragan Vujić, docent, dr Marko Petković, docent, dr Nemanja Miletić, docent, dr Igor Đurović, docent, dr Simeon Rakonjac, docent, dr Dalibor Tomić, docent, dr Ranko Koprivica, docent, dr Mirjana Radovanović, docent, dr Milan Lukić, viši naučni saradnik

Tehnički urednici

Spec. dr vet. med Miloš Petrović, dipl.inž. Dušan Marković

Tiraž: 100 primeraka

Štampa

Štamparija Birograf Comp, 11080 Beograd

Godina izdavanja, 2021

VARIJABILNOST SESKVITERPENA ETARSKIH ULJA VRSTE *TEUCRIUM MONTANUM* L.

Nenad Zlatić^{1*}, Vladimir Mihailović², Gorica Đelić¹, Marija Lješević³, Vladimir Beškoski⁴, Milan Stanković¹

Izvod: Cilj prikazanog istraživanja je utvrđivanje kvalitativne varijabilnosti i relativne zastupljenosti seskviterpenskih ugljovodonika u uzorcima vrste *Teucrium montanum* L. prikupljenih sa dva različita tipa podloge. Četiri uzorka etarskih ulja sa serpentinita i četiri sa krečnjaka dobijeno je metodom hidrodestilacije od nadzemnih biljnih delova. Na osnovu rezultata, pokazano je da populacije sa serpentinitnih staništa sintetišu 2 puta više seskviterpena nego sa krečnjačkih, dok je jedinjenje 6-epi- β -kubeben detektovan samo u populacijama sa krečnjaka. Edafske karakteristike staništa utiču na kvalitativni sastav i relativnu zastupljenost seskviterpena u etarskim uljima što ima značajnu primenu u biotehnologiji.

Gljučne reči: *Teucrium montanum*, krečnjak, serpentinit, eterična ulja

Uvod

Etarska ulja pripadaju grupi hidrofobnih hemijskih jedinjenja, koja se uglavnom sastoje od monoterpena i seskviterpena u različitim koncentracijama. Etarska ulja predstavljaju grupu prirodnih produkata biljaka na čiju sintezu uglavnom utiču spoljašnji faktori. Na biosintezu etarskih ulja utiče nekoliko faktora. Koncentracija i sastav određenih isparljivih jedinjenja uglavnom zavisi od genotipa vrste ali i od brojnih abiotičkih i biotičkih faktora (Marčetić i sar., 2017).

Edafski faktori kod biljnih organizama utiču na ekofiziološka svojstva u funkciji prilagođavanja. Biljke poseduju složene mehanizme adaptacije na određeni tip supstrata. Usled razvoja specifičnih adaptivnih mehanizama, određena isparljiva jedinjenja i nastali hemotipovi su uglavnom određeni vrstom supstrata (Marčetić i sar., 2017).

Zemljišta formirana na krečnjačkoj geološkoj podlozi sadrže kalcijum karbonat (CaCO_3) u slobodnoj formi. Ovakav tip zemljišta karakterističan je za sušne i umereno vlažne regione. Na hemijskom nivou, prisustvo CaCO_3 određuje alkalnu reakciju u krečnjačkim zemljištima i utiče na dostupnost određenih metala biljkama kao što su N, P, K, Mg, Zn, Cu i Fe. Osim hemijskog uticaja, CaCO_3 u

¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Institut za biologiju i ekologiju, Radoja Domanovića 12, 34000, Kragujevac, Republika Srbija (nenad.zlatic@pmf.kg.ac.rs);

²Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Institut za hemiju, Radoja Domanovića 12, 34000, Kragujevac, Republika Srbija;

³Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, Tehnologiju i Metalurgiju, Njegoseva 12, 11000, Beograd, Republika Srbija;

⁴Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Studentski trg 12-16, 11000, Beograd, Republika Srbija.

krečnjačkim zemljištima utiče i na fizičke karakteristike zemljišta (Zlatic i sar., 2017).

Serpentinska zemljišta imaju ekstremne fizičke i hemijske karakteristike. Ova zemljišta su kamenita i plitka, odlikuju se visokom poroznošću i imaju nizak kapacitet zadržavanja vode. Serpentinska zemljišta ogledaju se u nedostatku Ca i visokim koncentracijama Fe, Mg, Ni, Co i Cr (Zlatic i sar., 2017).

Vrsta *Teucrium montanum* je zastupljena na krečnjačkim staništima brdsko-planinskih regiona. Navedena vrsta ima primenu kod inflamatornih procesa respiratornog sistema i zamora. Čajevi se koriste za ublažavanje problema digestivnih organa (Zlatic i sar., 2017; Pavlova i sar., 2020).

Osnovni cilj ovog istraživanja je utvrđivanje varijabilnosti seskviterpena u etarskim uljima vrste *Teucrium montanum* uzorkovane na staništima sa krečnjačkom i serpentinitnom geološkom podlogom. Navedeno istraživanje obuhvata uporednu analizu kvalitativnog sastava i određivanje procenta relativne zastupljenosti seskviterpenskog ugljovodonika u uzorcima etarskih ulja vrste *Teucrium montanum* sa osam različitih staništa zastupljenih na dva različita tipa podloge. Istraživanje je sprovedeno radi određivanja uticaja podloge na sastav i zastupljenost seskviterpena u etarskim uljima vrste *Teucrium montanum* i primene u biotehničkim procesima.

Materijal i metode rada

Biljni material

Ispitivana vrsta je prikupljena sa osam lokaliteta na staništima sa krečnjačkom i serpentinitnom geološkom podlogom tokom 2016. i 2017. godine. Identifikacija uzorkovanih primeraka je izvršena u Institutu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matetičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu. Nadzemni biljni delovi su osušeni prirodnim putem u tamnoj prostoriji na sobnoj temperaturi, nakon čega su pulverizovani u blenderu i čuvani u obeleženim papirnim kesama do daljih analiza.

Izolovanje etarskih ulja

Osušeni biljni materijal je korišćen u procesu izolovanja etarskih ulja. Sto grama biljnog materijala je ubačeno u aparat po Klevendžeru. Nakon 3 sata hidrodestilacije, ulje je smešteno u tamne sterilne vaje i čuvano na 4 °C do daljih GC-MS analiza. Prinos ulja je izračunat za svaki uzorak na osnovu suve mase.

Sveobuhvatna GCxGC-MS hromatografija

Za određivanje kvalitativnog sastava i relativne zastupljenosti seskviterpenskog ugljovodonika u uzorcima etarskih ulja vrste *Teucrium montanum* sa staništa na krečnjačkoj i serpentinitnoj geološkoj podlozi korišćen je GCxGC-MS uređaj GCMS-

QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan). MS spektri su upoređeni sa NIST MS bibliotekom, dok su GCxGC-MS podaci analizirani korišćenjem GC Image softvera.

Rezultati istraživanja i diskusija

Rezultati analize uzoraka etarskih ulja vrste *Teucrium montanum* sa staništa na krečnjačkoj i serpentinitskoj geološkoj podlozi prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Kvalitativni sastav i procenat relativne zastupljenosti seskviterpenskih ugljovodonika u uzorcima etarskih ulja vrste *Teucrium montanum*
 Table 1. Qualitative composition and percentage of relative presence of sesquiterpene hydrocarbons in essential oil samples of *Teucrium montanum*

| Jedinjenja Compounds | C1* | C2 | C3 | C4 | S1 | S2 | S3 | S4 | **C (%) | S (%) |
|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|
| β -guajen | 0,00 | 0,71 | 0,00 | 0,13 | 1,34 | 1,11 | 1,36 | 0,33 | 0,21 | 1,04 |
| kedren | 0,12 | 0,06 | 0,06 | 0,36 | 1,73 | 0,45 | 0,81 | 0,10 | 0,15 | 0,77 |
| α -gurgujen | 0,00 | 0,06 | 0,00 | 0,71 | 0,00 | 0,10 | 0,00 | 0,52 | 0,19 | 0,16 |
| α -kopaen | 0,09 | 0,17 | 0,05 | 0,09 | 0,47 | 0,22 | 0,24 | 0,09 | 0,10 | 0,26 |
| γ -elemen | 0,11 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,30 | 0,30 | 0,09 | 0,08 | 0,06 | 0,19 |
| δ -kadinen | 0,07 | 0,16 | 0,00 | 0,08 | 0,81 | 0,33 | 0,16 | 0,00 | 0,08 | 0,33 |
| β -kopaen | 0,13 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,15 | 0,30 | 0,12 | 0,03 | 0,14 |
| β -vatioren | 0,14 | 0,19 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,27 | 0,00 | 0,08 | 0,07 |
| <i>cis</i> - β -farnesen | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,37 | 0,12 | 0,13 | 0,11 | 0,06 | 0,18 |
| α -kubeben | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,11 | 0,09 | 0,09 | 0,08 | 0,00 | 0,09 |
| kariofilen | 0,10 | 0,06 | 0,06 | 0,00 | 0,00 | 0,10 | 0,00 | 0,20 | 0,06 | 0,08 |
| α -bergamoten | 0,05 | 0,06 | 0,06 | 0,05 | 0,27 | 0,11 | 0,23 | 0,00 | 0,06 | 0,15 |
| kopaen | 0,00 | 0,05 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 0,00 |
| α -jlangen | 0,08 | 0,00 | 0,00 | 0,05 | 0,25 | 0,00 | 0,10 | 0,00 | 0,03 | 0,09 |
| β -kurkumen | 0,00 | 0,00 | 0,07 | 0,12 | 0,26 | 0,00 | 0,10 | 0,00 | 0,05 | 0,09 |
| β -jlangen | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,13 | 0,14 | 0,00 | 0,00 | 0,07 |
| α -kalakoren | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,08 | 0,00 | 0,17 | 0,00 | 0,13 | 0,02 | 0,08 |
| (+)-ciklosativen | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,09 | 0,19 | 0,09 | 0,00 | 0,09 |
| kadalen | 0,05 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,09 | 0,03 | 0,02 |
| (-)- β -bourbonen | 0,05 | 0,00 | 0,05 | 0,05 | 0,00 | 0,09 | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 0,02 |
| 6-epi- β -kubeben | 0,12 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,08 | 0,00 |
| Zbir Sum | 1,34 | 1,93 | 0,96 | 2,20 | 6,66 | 4,13 | 5,59 | 2,26 | 1,61 | 4,66 |
| Prinos (%) Yields (%) | 0,04 | 0,06 | 0,04 | 0,06 | 0,35 | 0,08 | 0,36 | 0,20 | 0,05 | 0,25 |

*C1 – populacija sa krečnjačkih staništa; S1 – populacija sa serpentinitskih staništa.

**C(%) – prosečne vrednosti krečnjak; S(%) – prosečne vrednosti serpentinit.

*C1 – population from calcareous habitat; S1 – population from serpentinite habitat.

**C(%) – average values calcareous; S(%) – average values serpentinite.

Prinos etarskih ulja u uzorcima vrste *Teucrium montanum* uzorkovanih sa krečnjačkih i serpentinitnih staništa prikazan je u Tabeli 1. Prinosi etarskog ulja u populacijama sa krečnjaka se kreću od 0,04% do 0,06%, dok se u populacijama sa serpentinita kreću od 0,08% do 0,36%. Najveći prinosi za uzorke etarskog ulja primećeni su kod populacije uzorkovanih sa serpentinita, dok su najmanji prinosi zabeleženi kod populacija sa krečnjaka. Prosečan prinos uzoraka etarskog ulja za populacije sa krečnjaka bio je 0,05%, dok je za populacije sa serpentinita iznosio 0,25%, što je pet puta više nego za populacije sa krečnjaka. Vuković i sar. (2007) pokazali su da je prinos etarskog ulja za populacije *Teucrium montanum* sa teritorije Srbije iznosio 0,47% na osnovu suve mase.

Kvalitativni sastav etarskih ulja u populacijama *Teucrium montanum* uzorkovanih sa krečnjačkih i serpentinitnih staništa odlikovalo se prisustvom preko hiljadu pikova u uzorcima, pri čemu je za prikaz rezultata odabrano 21 jedinjenje najzastupljenijih seskviterpenskih ugljovodonika (Tabela 1). Zbir ukupne relativne zastupljenosti identifikovanih jedinjenja koja pripadaju grupi seskviterpenskih ugljovodonika u populacijama sa krečnjaka se kretao od 0,96% do 2,20%, dok se u populacijama sa serpentinita kretao od 2,26% do 6,66%. Prosečne vrednosti relativne zastupljenosti seskviterpenskih ugljovodonika u populacijama sa krečnjaka su iznosile 1,61%, dok su za populacije sa serpentinitite iznosile 4,66%.

Prethodno objavljeni rezultati o sastavu etarskih ulja vrste *Teucrium montanum* iz Srbije ukazali su da su glavne komponente etarskih ulja seskviterpeni (Vuković i sar., 2007), što je u skladu sa našim rezultatima. Poredeći populacije uzorkovane sa krečnjaka a serpentinita, primećeno je da populacije prikupljene sa serpentinitnih staništa sintetišu dvostruko više seskviterpenskih ugljovodonika u odnosu na populacije sa krečnjačkih staništa.

Među seskviterpenskim ugljovodonicima, najzastupljenije jedinjenje je β -guajen (1,25%). Na osnovu naših rezultata i rezultata drugih autora može se uočiti nepravilnost u procentu određenih jedinjenja, koja u velikoj meri zavise od faktora životne sredine koji su prisutni na određenim staništima. Mnogi istraživači su u svojim studijama došli do sličnih zaključaka (Rajčević i sar., 2020).

Među jedinjenjima sa najvećim procentom relativne zastupljenosti u populacijama sa krečnjaka je β -guajen (0,21%), α -gurgujen (0,19%) i kedren (0,15%). Među jedinjenjima sa najvećim procentom relativne zastupljenosti u populacijama sa serpentinitite je β -guajen (1,04%), kedren (0,77%) i δ -kadinen (0,33%).

Seskviterpenski ugljovodonici koji su jedino identifikovani u serpentinitnim populacijama su α -kubeben (0,09) i (+)-ciklosativen (0,09), dok je 6-epi- β -kubeben (0,08) jedino identifikovan u uzorcima sa krečnjaka.

Uticao supstrata na biosintezu etarskih ulja specifičan je i zavisi od biljnih vrsta. Istraživanja su pokazala da postoje brojne razlike u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu etarskih ulja kod vrsta uzorkovanih na različitim supstratima (Marčetić i sar., 2017). Krečnjačka i serpentinitna staništa slična su u pogledu fizičke suše zbog uticaja visokih temperatura na staništima. Međutim, glavna razlika između

ovih tipova staništa je prisustvo makro- i mikroelemenata u zemljištu. Zemljišta formirana na krečnjačkoj geološkoj podlozi sadrže veće koncentracije makroelemenata (Ca, N, K i P) koje su potrebne biljkama za normalan ontogenetski razvoj, dok ne sadrže visoke koncentracije teških metala. Zemljišta formirana na serpentinitskoj geološkoj podlozi odlikuju se nedostatkom osnovnih makroelemenata i sadrže veće koncentracije teških metala kao što su Cr, Ni i Mn (Zlatic i sar., 2017).

Nedostatak određenih makroelemenata pozitivno utiče na sintezu jedinjenja terpena. Usled nedostatka makroelemenata, biljke preusmeravaju biosintetske procese ka stvaranju većih količina isparljivih jedinjenja na bazi terpena ili potpuno novih jedinjenja različite hemijske strukture (Marčetić i sar., 2017).

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da se populacije vrsta *Teucrium montanum* uzorkovane sa zemljišta formiranim na krečnjačkoj i serpentinitskoj geološkoj podlozi razlikuju prema količini i sastavu etarskih ulja. Populacije biljaka sa serpentinita imaju pet puta veći prinos etarskih ulja od populacije sa krečnjaka. Takođe, populacije biljaka sa serpentinitskih staništa sintetišu dvostruko više seskviterpenskih ugljovodonika za razliku od populacija sa krečnjačkih staništa. Među seskviterpenskim ugljovodonicima, najzastupljenije jedinjenje je β -guajen za oba tipa staništa. Seskviterpenski ugljovodonici koji su jedino identifikovani u serpentinitskim populacijama su α -kubeben i (+)-ciklosativen, dok je 6-epi- β -kubeben jedino identifikovan u uzorcima sa krečnjaka. Rezultati predstavljeni u ovoj studiji ukazuju na dominantan uticaj supstrata na prinos i kvalitativni sastav etarskih ulja vrste *Teucrium montanum* što može imati značajnu primenu u biotehnologiji i produkciji etarskih ulja.

Napomena

Ovo istraživanje finansiralo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Broj ovlašćenja: 451-03-68/2020-14/200122).

Literatura

- Marčetić M., Kovačević N., Lakušić B., Lakušić B. (2017). Habitat-related variation in composition of the essential oil of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae). *Phytochemistry*. 135: 80-92.
- Rajčević N., Dodoš T., Novaković J., Janačković P., Marin P.D. (2020). Epicuticular wax variability of *Juniperus deltoides* R.P. Adams from the central Balkan – Ecology and chemophenetics. *Biochemical Systematics and Ecology*. 89:104008.
- Vuković N., Milošević T., Sukdolak S., Solujić S. (2008). The chemical composition of the essential oil and the antibacterial activities of the essential oil and

- methanol extract of *Teucrium montanum*. Journal of the Serbian Chemical Society. 73(3): 299-305.
- Zlatic N.M., Stanković M.S., Simić Z.S. (2017). Secondary metabolites and metal content dynamics in *Teucrium montanum* L. and *Teucrium chamaedrys* L. from habitats with serpentine and calcareous substrate. Environmental Monitoring and Assessment. 189(3): 110.
- Pavlova D., Karadjova I., Stanković M., Zlatic N. (2020). Ecology of *Teucrium* species: Habitat related metal content dynamics. In: Stanković M. (eds) *Teucrium* species: Biology and Applications. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-52159-2_4

VARIABILITY OF SESQUITERPENES IN ESSENTIAL OILS OF THE SPECIES *TEUCRIUM MONTANUM* L.

Nenad Zlatic^{1*}, Vladimir Mihailović², Gorica Đelić¹, Marija Lješević³, Vladimir Beškoski⁴, Milan Stanković¹

Abstract

The aim of this study is to determine the qualitative variability and relative presence of sesquiterpene hydrocarbons in essential oils samples of *Teucrium montanum* L. collected from two different substrate types. Four samples of essential oils from serpentinite and four from calcareous were obtained by the method of hydrodistillation from aboveground plant parts. Based on the results, it was shown that populations from serpentinite habitats synthesize 2 times more sesquiterpenes than from calcareous ones, while the compound 6-epi- β -cubeben was detected only in populations from calcareous. Edaphic characteristics of habitats affect the qualitative composition and relative presence of sesquiterpenes in essential oils, which has a significant application in biotechnology.

Key words: *Teucrium montanum*, calcareous, serpentinite, essential oils

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000, Kragujevac, Republic of Serbia (nenad.zlatic@pmf.kg.ac.rs);

²University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000, Kragujevac, Republic of Serbia;

³University of Belgrade, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Njegoseva 12, 11000, Belgrade, Republic of Serbia;

⁴University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Studentski trg 12-16, 11000, Belgrade, Republic of Serbia.

CIP - Каталогизација у публикацији - Народна библиотека Србије, Београд

63(082)(0.034.2)

606:63(082)(0.034.2)

SAVETOVANJE o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem (26 ; 2021 ; Čačak)

Zbornik radova [Elektronski izvor] / XXVI savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Čačak, 12 - 13. mart 2021. godine ; [organizator]

Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku. - Čačak :

Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet, 2021 (Beograd : Birograf Comp). - 1 elektronski optički disk (CD-ROM) ; 12 cm

Sistemske zahteve: Nisu navedeni. - Nasl. sa naslovne strane dokumenta. -

Radovi na srp. i engl. jeziku. - Tiraž 100. - Bibliografija uz svaki rad.

ISBN 978-86-87611-80-1

a) Пољопривреда - Зборници b) Биотехнологија - Зборници

COBISS.SR-ID 33682953

DOI: 10.46793/SBT26