

# Alelopatski učinak žljezdastog nedirka (*Impatiens glandulifera* Royle) na bijelu gorušicu (*Sinapis alba* L.)

---

Zelić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:924835>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Katarina Zelić**

**Alelopatski učinak žljezdastog nedička (*Impatiens glandulifera* Royle) na bijelu gorušicu (*Sinapis alba* L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za Farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane-Marije Domijan.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan, na velikoj potpori, strpljenju i iznimnoj dostupnosti tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala i asistentu Ivanu Duki, mag. pharm., i asistentici Tihani Vilović, mag. oecol., na stručnim savjetima i ustupljenim materijalima.*

*Posebno se zahvaljujem svim kolegama, prijateljima i Franu koji su mi razdoblje studiranja učinili jednim od najljepših perioda u životu.*

*I na kraju, najveća zasluga za sve što sam postigla pripada mojim roditeljima, sestri, bratu i baki, koji su mi pružali bezgraničnu ljubav i podršku tijekom svih godina studija.*

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Alelopatija.....	2
1.2. Alelokemikalije.....	2
1.3. <i>Impatiens glandulifera</i> Royle - žljezdasti nedarak .....	3
1.4. Oksidacijski stres u biljaka .....	7
1.4.1. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS-ovi).....	7
1.4.2. Lipidna peroksidacija .....	8
1.4.3. Obrambeni sustav biljaka u oksidacijskom stresu .....	9
1.4.3.1. Glutation (GSH) .....	10
1.4.3.2. Flavonoidi - antocijanini .....	11
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	12
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	14
3.1. Materijali.....	15
3.1.1. Kemikalije .....	15
3.1.2. Oprema.....	15
3.1.3. Biljni model.....	16
3.2. Metode .....	17
3.2.1. Biološki pokus – germinacija.....	17
3.2.1.1. Priprema otopina .....	17
3.2.1.2. Provođenje biološkog pokusa.....	17
3.2.1.3. Priprema homogenata tkiva za mjerenje biokemijskih parametara... 18	
3.2.2. Metoda određivanja GSH.....	18
3.2.2.1. Princip metode.....	18
3.2.2.2. Priprema otopina za određivanje GSH.....	19
3.2.2.3. Postupak .....	20

3.2.3. Metoda određivanja antocijanina .....	20
3.2.3.1. Princip metode.....	20
3.2.3.2. Postupak .....	21
3.2.4. Metoda određivanja MDA .....	22
3.2.4.1. Princip metode.....	22
3.2.4.2. Priprema otopina za određivanje MDA .....	23
3.2.4.3. Postupak .....	23
3.2.5. Statistička obrada rezultata .....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>25</b>
4.1. Masa svježeg tkiva.....	26
4.2. GSH .....	27
4.3. Antocijanini .....	29
4.4. MDA.....	31
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>37</b>
<b>7. SAŽETAK / SUMMARY .....</b>	<b>43</b>
<b>8. PRILOG .....</b>	<b>46</b>
<b>9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

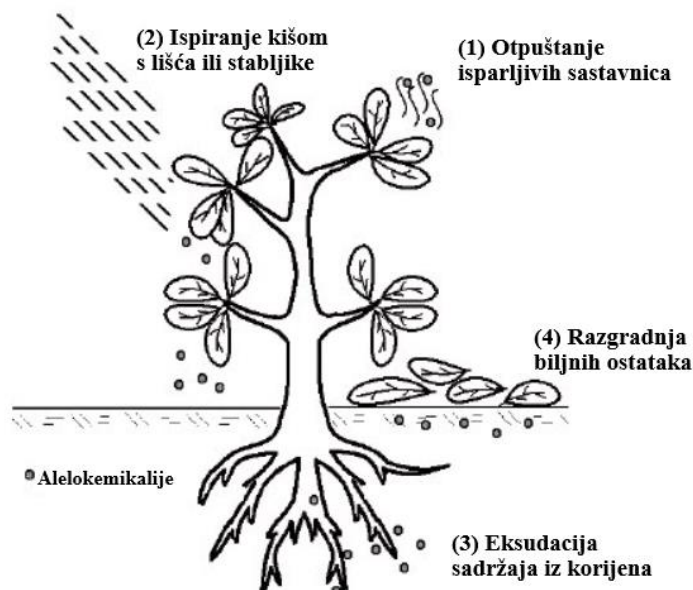
# **1. UVOD**

## 1.1. Alelopatija

Pojam alelopatije se najčešće poistovjećuje sa štetnim učinkom jedne biljke na drugu koji je postignut otpuštanjem sekundarnih metabolita u okoliš. Dakako, kroz povijest su postojala različita objašnjenja i poteškoće u razumijevanju alelopatskog procesa. Iako je koncept alelopatije bio poznat još u razdoblju od prije dvije tisuće godina, sam naziv je nastao relativno nedavno, tj. u prvoj polovici 20. stoljeća. Za to je zaslužan češko-austrijski botaničar Hans Molisch, nazivan i „ocem alelopatije“. Korijen riječi alelopatija ima uporište u riječima iz grčkog jezika: *allelon* – uzajaman, jedan od drugoga, i *pathos* – patiti. Za Molischa je alelopatija predstavljala isključivo faktor povezan s dominacijom te nije uzimao u obzir mogućnost pozitivne uloge alelopatije u održavanju biljne raznovrsnosti. Takvo stajalište i naziv koji je do danas ostao u uporabi može zabunom izazvati kriva tumačenja ove pojave. Naime, poznato je da su alelopatske interakcije rijetko kada recipročne, kako sugerira korijen riječi *allelon*, i nisu nužno štetne iako bi se to moglo zaključiti po završetku riječi – *pathos*. Kako bi pogrešna interpretacija bila svedena na najmanju razinu, od 1971. godine se u uporabu uveo širi pojam, alelokemikalije, koji pojednako obuhvaća i stimulatorne efekte. Međutim, već 1984. godine je ponovno preispitan sam naziv, alelopatija, te ga je profesor E. L. Rice, jedan od najistaknutijih znanstvenika u polju alelopatije nedvojbeno definirao kao bilo koji izravan ili neizravan, štetan ili koristan utjecaj jedne biljne vrste (uključujući i mikroorganizme) na drugu proizvodnjom kemijskih sastavnica koje su se otpustile u okoliš (Willis, 2007).

## 1.2. Alelokemikalije

Alelokemikalije su nenutritivni sekundarni metaboliti biljke te mogu biti različito smješteni unutar biljnih organa, npr. u sjemenkama, cvijetu, peludi, listovima, stabljici i korijenu (ne nužno u svemu navedenom). U preglednom znanstvenom radu Zeman i suradnika (2011), opisana su četiri načina oslobađanja alelokemikalija iz biljke. Na slici 1 prikazani su načini otpuštanja alelokemikalija u okoliš. Kao prvi način je navedeno oslobađanje u obliku plinova iz lišća te se najčešće odvija u suhim uvjetima, a biljke akceptori ih apsorbiraju iz atmosfere. Drugi je način ispiranje sa stabljike ili lišća za vrijeme padalina (rose, magle, kiše i snijega) i apsorpcija putem korijena. Treći način se odnosi na izlučivanje iz korijena, a druge ih biljke upijaju također putem korijena. Četvrti je način putem razgradnje biljnih ostataka, pri čemu alelokemikalije dospijevaju u rizosferu nakon odumiranja i raspadanja lišća ili drugih organa.



**Slika 1.** Mogući putevi otpuštanja alelokemikalija u okoliš (preuzeto iz: Albuquerque i sur., 2011. i prilagođeno).

Alelopatske sastavnice su prilikom otpuštanja iz biljke podložne nekim metaboličkim ili okolišnim promjenama u kemijskoj strukturi nakon čega su biološki aktivne. U knjizi „Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry“ autor Haig (2008) daje pregled različitih podskupina alelokemikalija na temelju njihove kemijske strukture. Nabrojane su i opisane kategorije:

- 1) Glukozinolata
- 2) Fenola
- 3) Terpenoida
- 4) Alkaloida
- 5) Hidroksamskih kiselina – benzoksazinoida (DIMBOA i DIBOA)
- 6) Flavanoida, kinona, poliacetilena i ostalih.

### **1.3. *Impatiens glandulifera* Royle - žljezdasti neditrak**

*Impatiens glandulifera* Royle (hrv. žljezdasti neditrak) je invazivna biljna vrsta koja podrijetlo vuče s himalajskog područja te je prvotno u Europu stigla kao ukrasno bilje. Prvi



spomeni žljezdastog nedirka na tlu Hrvatske datiraju iz 1968. godine kada je opisana kao dio flore uz rijeku Savu i okolicu grada Zagreba (Marković, 1970.). Nakon tog literaturnog navoda, uslijedili su i brojni drugi te tako potvrdili raširenost žljezdastog nedirka na našem teritoriju (slika 2).



**Slika 2.** Rasprostranjenost vrste *I. glandulifera* Royle u Hrvatskoj (preuzeto iz: [www.hirc.botanic.hr](http://www.hirc.botanic.hr)).

Prema taksonomskoj podjeli, vrsta *I. glandulifera* pripada redu Ericales (hrv. vrjesolike) koji sadrži 25 porodica s 346 rodova i 11 500 vrsta. Veliki red Ericales se odlikuje unilakularnim nodijama, pentamernim i pentacikličkim cvjetovima, fitokemijskim osobinama (tanini, elagička kiselina, hidrokinoni) i dr. Zanimljiv je podatak da se cvjetovi koji pripadaju ovom redu mogu učestalo naći među fosilima od prije skoro 50 milijuna godina (Nikolić, 2013).

Nadalje, žljezdasti nedirak se svrstava u biljnu porodicu Balsaminaceae (hrv. neticaljke), koja sadrži svega dva roda: *Hydrocera* (monotip) i *Impatiens*. Nedirak (*Impatiens*) je rod s približno 850 vrsta pretežito tropskih jednogodišnjih ili trajnih zeljastih biljaka. Imaju jednostavne listove i dvospolne, jednosimetrične (zigomorfne) cvjetove s čaškom, koju čini 3 do 5 većinom živo obojenih lapova, i vjenčićem s 5 latica, od kojih su po dvije bočne međusobno srasle. Gornji lap čaške produljen je u ostrugu. Prašnika je 5, a plodnica je nadrasla. Plod je duguljast tobolac koji se, osobito na dodir (otuda ime), naglo i elastično otvara, pa sjemenke lete na sve strane - samorasprostranjivanje („nedirak“).

Žljezdasti nedarak je velika i snažna jednogodišnja zeljasta biljka (teofit), koja uobičajeno naraste 1-2,5 m (slika 3). Stabljika je debela, glatka, jednostavna ili ponekad razgranjena. Primarni je korijen do 15 cm dubok, praćen obilnim adventivnim korijenjem iz donjih nodija biljke. Listovi su nasuprotni ili po 3 u pršljenu, suličasta do eliptična oblika, dugi 5-18 cm, široki 2,5-7 cm, glatki. Baza lista je klinasta i kratko se spušta niz peteljku, vrh je ušiljen, rub je pilast, sa svake strane po (18-)25-50 šiljastih zubaca i žljezdast pri bazi (slika 4). Po (3-)5-12 cvjetova skupljeno je u grozdaste cvatove koji se razvijaju u pazušcima listova. Cvjetovi su vizualno atraktivni, nepravilni, veliki 2,5-4 cm, purpurnoružičasti, rijetko bijeli, s obilnom proizvodnjom nektara. Ocvijeće je građeno od 3 lapa i 5 latica. Od 3 lapa najniži je velik, nalik latici i vrećast, dimenzija 12-20 x 9-17 mm. Naglo se sužuje u ravnu ostrugu dugu 2-5(-7) mm. Bočni su lapovi manji, okruglasti i najčešće zeleni. Od 5 latica gornja je najveća, dok su 4 donje srasle u po dva bočna para kojima su ostala slobodna samo dva gornja režnja, a sve zajedno oblikom podsjeća na kacigu. Pet slobodnih prašnika alternira s laticama. Nadržala plodnica građena je od 5 međusobno sraslih plodnih listova. Cvjeta u srpnju i kolovozu, a oprašuje se kukcima, osobito pčelama i bumbarima. Plod je kijačasti tobolac, dug 1,5-3 cm, glatke površine u kojem nastaje do 16 sjemenki, ukupno i do 4000 po jedinci. Gusta populacija s 1 m<sup>2</sup> može proizvesti i do 32 000 sjemenki. Tobolci se otvaraju eksplozivno i raspršuju sjemenke i do 7 m udaljenosti od matične biljke, a iste se dobro rasprostiru i vodenim tokovima (Nikolić i sur., 2014).

Vrsta *I. glandulifera* uspijeva u umjerenim klimatskim područjima, s visokom relativnom i izmjenjivom vlažnošću. Ne tolerira manjak vode te za sušnih razdoblja brzo ugiba. Vrlo je osjetljiva na proljetne i jesenje mrazove. Uspijeva u poluzasjenjenim do potpuno osunčanim staništima te tolerira širok raspon tipova tala. Brzo se širi zbog velike produkcije sjemenki i uspješnog mehanizma rasprostranjivanja vodenim tokovima i nenamjerno antropohorno (transport tla, otpada i sl.).



**Slika 3.** Žljezdasti nedarak, *Impatiens glandulifera* Royle, Balsaminaceae (slikao: D. Hruševar).



**Slika 4.** List žljezdastog nedaraka koji je korišten u eksperimentu za izradu ekstrakta (slikao: D. Hruševar).

## 1.4. Oksidacijski stres u biljaka

Stres je svako stanje biološkog sustava koje odstupa od optimuma, te se u biljnom svijetu definira kao rezultat djelovanja bilo kojeg abiotskog i/ili biotskog čimbenika koji nepovoljno utječe na rast i razvoj biljaka. Biljke su izložene mnogim oblicima stresa iz okoliša čiji intenzitet mogu tolerirati. No kad je taj prag stresa prekoračen, biljke će trpjeti stres, a ako je on dovoljno snažan, biljka može umrijeti. Okolišni abiotški čimbenici su klasificirani kao:

- 1) klimatski čimbenici: svjetlost, temperatura, vlažnost i zrak
- 2) edafski čimbenici: fizikalna, kemijska i biološka svojstva tla, matične stijene i matičnog supstrata tla
- 3) orografski ili fiziografski čimbenici: svojstva reljefa (nadmorska visina, nagib terena, ekspozicija, razvedenost reljefa i dr.).

Okolišne biotske čimbenice predstavljaju organizmi (biljke, životinje, mikroorganizmi, ljudi) te odnosi među njima, npr. alelopatski odnosi biljaka (kompeticija), ispaša (životinje), bolesti (patogeni), umjetna gnojidba i zaštita od bolesti (antropogeni učinak). Poznato je puno primjera alelopatskih odnosa, iako je još uvijek nedovoljno poznat mehanizam sinteze i djelovanja većine kemijskih tvari koje sudjeluju u alelopatskim odnosima. Postoji klasifikacija alelokemikalija na:

- antibiotike – inhibitori u međuodnosima mikroorganizama
- fitoncide – izlučevine viših biljaka koje djeluju na mikroorganizme
- marazmine – izdvajaju ih mikroorganizmi i djeluju na više biljke
- koline – kemijski inhibitori viših biljaka koji djeluju na više biljke

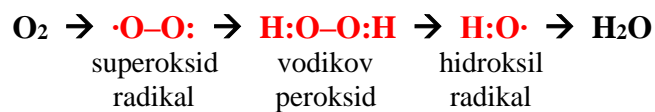
Međusobni utjecaj biljaka putem izlučivanja navedenih tvari može biti izražen kroz stimulaciju, inhibiciju i letalno djelovanje (Vukadinović i sur., 2014).

### 1.4.1. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS-ovi)

Oksidacijski stres je kemijski i fiziološki kompleksan fenomen, a nastaje kao rezultat pretjeranog stvaranja i akumulacije molekula koje sadrže aktivirani kisik, odakle i naziv reaktivni kisikovi spojevi (ROS, eng. *reactive oxygen species*). ROS-ovi se zajedno s reaktivnim dušikovim i ugljikovim spojevima ubrajaju u slobodne radikale, a pod tim se pojmom podrazumijevaju sve kemijske vrste koje postoje samostalno i sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci. Važno je napomenuti da svi ROS-ovi nisu ujedno i

slobodni radikali (npr.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), iako djeluju jednako na stanične komponente, oksidirajući ih i promovirajući oksidacijski stres (Demidchik, 2014).

ROS-ovi se aktivno stvaraju kao signalne molekule u: procesima programirane stanične smrti, odgovoru na abiotski stres, obrani od patogena, sistemskoj signalizaciji i dr. Još jedan način stvaranja ROS-ova, a koji se kontinuirano odvija, je u obliku toksičnih nusprodukata aerobnog metabolizma biljaka te se kao takvi brzo uklanjaju pomoću različitih enzimskih i neenzimskih staničnih mehanizama. Atmosferski molekularni kisik nije toksičan za aerobne organizme i nije kemijski aktivan, iako ima dva nesparena elektrona u vanjskoj ljusci ( $\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$ ). Veću reaktivnost molekularni kisik može postići na dva načina: (i) apsorpcijom energije čime prelazi iz tripleta u singlet kisika ( $\text{O}-\text{O}\cdot$ ), gdje dva nesparena elektrona imaju suprotne spinove te su zbog toga aktivniji, i (ii) monovalentnom redukcijom gdje iz molekularnog kisika nastaje voda (Pandhair i Sekhon, 2006). Na slici 5 je prikaz redukcije molekularnog kisika do vode gdje u međukoracima reakcije nastaju ROS-ovi: superoksid radikal ( $\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i hidroksil radikal ( $\text{H}\cdot\text{O}\cdot$ ). Za ovaj proces potpune redukcije, molekula kisika je trebala primiti četiri elektrona ( $e^-$ ).



**Slika 5.** Prikaz nastajanja ROS-ova prilikom redukcije molekularnog kisika.

Izvori proizvodnje ROS-ova se ne nalaze samo na kloroplastima (fotosinteza), mitohondrijima (oksidativna fosforilacija) i peroksisomima (glioksilatni ciklus) gdje se odvijaju metaboličke reakcije, već se ROS-ovi mogu sintetizirati i na enzimatski način NADPH oksidazama i peroksidazama (odgovor na patogene i okolišne stresne čimbenike). Povećano stvaranje ROS-ova tijekom izloženosti biljke stresnim čimbenicima predstavlja prijetnju normalnom rastu i razvoju stanica, ali je jednako tako i signal za aktivaciju obrambenih mehanizama biljke (Mittler, 2002).

#### 1.4.2. Lipidna peroksidacija

Povišene razine ROS-ova mogu izazvati oštećenja na biomolekulama poput lipida, proteina i DNA. Takve reakcije mogu utjecati na promjenu intrinzičnih svojstava membrane, npr. fluidnosti, transporta iona, gubitka enzimske aktivnosti, inhibicije sinteze proteina, oštećenja DNA te naposljetku stanične smrti. Povećana peroksidacija (degradacija) lipida je

opažena kod biljaka koje su se razvijale u stresnim okolišnim uvjetima. Rast lipidne peroksidacije korelira s rastom koncentracije ROS-ova u stanici. Malondialdehid (MDA) predstavlja krajnji produkt peroksidacije nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima te se smatra odgovornim za oštećenje stanične membrane. Svega jedan hidroksilni radikal može sudjelovati u peroksidaciji brojnih nezasićenih masnih kiselina (PUFA, eng. *polyunsaturated fatty acids*) jer su reakcije uključene u taj proces dio cikličkih lančanih reakcija.

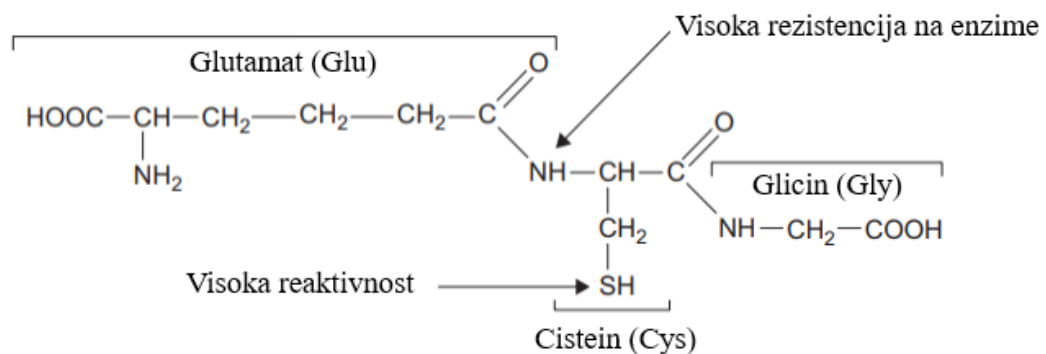
Prva faza lipidne peroksidacije se naziva inicijacijom i u njoj nastaju radikali masnih kiselina. Tako nastali ugljični radikali su vrlo reaktivni, tvore konjugirane diene te prelaze u fazu propagacije. U toj drugoj fazi, ugljični radikal reagira s molekulskim kisikom i dolazi do stvaranja peroksil radikala. Razgradnjom lipidnih hidroperoksida (PUFA–OOH) se stvaraju i nakupljaju lipidni alkoksi radikali, aldehidi (MDA, akrolein), alkani, lipidni epoksidi i alkoholi (Sharma i sur., 2012). MDA ubrajamo u kratkolančane produkte finalne faze lipidne peroksidacije te su kao takvi reaktivni, ali stabilniji od ROS-ova. MDA se smatra pouzdanim markerom kod određivanja lipidne peroksidacije jer se jednostavno dokazuje reakcijom s tiobarbituratnom kiselinom.

#### **1.4.3. Obrambeni sustav biljaka u oksidacijskom stresu**

Sesilni način života je zahtijevao od biljaka što fleksibilniju prilagodbu na postojeće okolišne čimbenike. Biljke posjeduju kompleksan antioksidacijski, obrambeni sustav koji se sastoji od antioksidacijskih enzima i neenzimskih antioksidansa koji uklanjaju postojeće ROS-ove. Sve stanice eukariotskih organizama sadrže snažne antioksidacijske enzime koje možemo podijeliti na tri veće skupine: superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i peroksidaze (PX). Superoksid-dismutaza je enzim koji katalizira raspad superoksidnog radikala na molekulski kisik i vodu, a najzastupljeniji izoenzimi u biljnih vrsta su Mn-SOD, Cu/Zn-SOD i Fe-SOD. Enzimi CAT i PX su zaslužni za uklanjanje vodikovog peroksida (Sies, 1997). Neenzimski antioksidacijski obrambeni sustav se sastoji od niskomolekularnih komponenti, kao što su askorbatna kiselina i glutation koji su aktivni u vodenoj fazi, dok su lipofilniji antioksidansi (npr.  $\alpha$ -tokoferol i  $\beta$ -karoten) aktivniji u membranama. Osim prethodno navedenih skupina, u neenzimske antioksidanse ubrajamo još i fenole (flavanoide) i prolin. Razine ovih antioksidansa su povišene tijekom borbe s velikom količinom novonastalih ROS-ova uslijed raznih stresova (Waśkiewicz i sur., 2014).

### 1.4.3.1. Glutation (GSH)

Glutation je tripeptid ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicin) koji se pretežno javlja u reduciranom obliku (GSH), a pod nekim fiziološkim okolnostima prelazi u oksidirani oblik (GSSG). Izopeptidna veza između amino grupe cisteina i  $\gamma$ -karboksilne skupine glutaminske kiseline određuje sposobnost visoke rezistencije tripeptida na enzimsku aktivnost, dok tiolna skupina utječe na reaktivnost glutaciona (slika 6). Enzim  $\gamma$ -glutamiltransferaza (GGT) ima sposobnost hidrolize  $\gamma$ -glu-cys veze, čime nastaje cisteinil-glicin kojeg razlažu druge peptidaze.



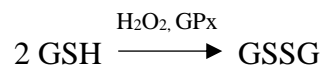
Slika 6. Kemijska struktura glutaciona.

Biosinteza glutaciona započinje formiranjem  $\gamma$ -glutamil-cisteina što je katalizirano  $\gamma$ -glutamilcistein sintetazom te je reakcija ovisna o ATP-u kao izvoru energije. U sljedećem koraku se formira veza između  $\gamma$ -glutamil-cisteina i glicina uz enzim glutation sintetazu.

Tiolna skupina (-SH) u molekuli glutaciona ima reducirajuća i nukleofilna svojstva te uslijed reakcije sa slobodnim radikalima može oksidirati:



Osim neenzimske oksidacije, moguća je i enzimska reakcija koja je katalizirana glutation peroksidazom uz prisutnost  $\text{H}_2\text{O}_2$  i organskih peroksida.



Razina GSH, za razliku od drugih staničnih tiola, je vrlo visoka te se akumulira u milimolarnim koncentracijama, a najviše razine su pronađene u kloroplastima. Osim u kloroplastu, glutation je lokaliziran i u citosolu, endoplazmatskom retikulumu, vakuolama, mitohondrijima, peroksisomima i apoplastu. Prije određivanja koncentracije slobodnog glutaciona, proteini moraju biti istaloženi korištenjem neke jake kiseline, poput sulfosalicilne, perklorne ili trikloroctene. Nakon centrifugiranja otopina sadrži slobodni glutation bez proteina te se takvi uzorci mogu koristiti za daljnja mjerenja: fluorometriju, spektrofotometriju ili HPLC

metodu. Većina metoda se bazira na produktima koji nastaju prilikom derivatizacije glutatationa. U takvim analitičkim metodama se koriste kolorimetrijski reagensi, npr. Ellmanov reagens i Sangerov reagens. Glutathion je ključni faktor u održavanju stanične redoks homeostaze i borbe protiv abiotskih i biotskih stresova (Waśkiewicz i sur., 2014).

#### **1.4.3.2. Flavonoidi - antocijanini**

U složenu grupu spojeva fenola i polifenola se ubrajaju flavonoidi koji su najzastupljeniji u listovima i reproduktivnim organima biljaka gdje su locirani većinom u vakuoli i apoplastu. Zbog fenolne -OH skupine koju posjeduju, u *in vitro* uvjetima mogu pokazati učinkovitiju antioksidacijsku aktivnost od primjerice askorbata ili tokoferola. Zato ne iznenađuje činjenica da one biljke koje sadrže visoku koncentraciju flavonoida (npr. antocijanina) ujedno imaju i veći antioksidacijski kapacitet. Flavonoidi se mogu ponašati kao proton ili elektron donori, stoga sudjeluju u uklanjanju vodikovog peroksida te ujedno mogu kelirati metale (Szóllósi R., 2014).

Antocijanini pripadaju skupini vodotopljivih biljnih pigmenata koji mogu biti crvene, ljubičaste ili plave boje ovisno o pH koji je prisutan u mikrookruženju. Kemijska struktura antocijanina sadrži uz aglikonski dio (antocijanidinski) i šećernu skupinu, a često može sadržavati i acilnu skupinu. Antocijanini se smatraju učinkovitim antioksidansima koji mogu inhibirati autooksidaciju masnih kiselina.



## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Invazivne biljke pripadaju alohtonoj flori (unešene, strane, pridošle; eng. *allochthonous*) koja ima izrazitu sposobnost razmnožavanja u područjima udaljenim od mjesta roditeljskih biljaka što je često praćeno brzim širenjem i brojnim jedinkama. Žljezdasti nedirak, *Impatiens glandulifera* Royle, Balsaminaceae, potječe iz područja Himalaje, sjevernog Pakistana, sjeverne Indije i Nepala. Naturaliziran je u mnogim zemljama Europe gdje se nekad uzgajao kao ukrasna i medonosna biljka, a danas predstavlja invazivni korov. Uspješan je u kompeticiji sa zavičajnim biljkama za prostor, oprašivače, sunčevu svjetlost i nutrijente (Nikolić i sur., 2014). Utjecaj na smanjivanje biološke raznolikosti je dodatno pojačan negativnim alelopatskim učinkom vrste *I. glandulifera* na druge biljke. Naime, poznato je da vrste roda *Impatiens* sadrže razne naftokinone koji se smatraju fenolnim sastavnicama s potencijalnim antimikrobnim i alelopatskim osobinama. U znanstvenom radu Vrchotová i suradnika (2011) pokazano je da vrsta *I. glandulifera* ima visok sadržaj naftokinina u usporedbi s ostalim vrstama iz iste porodice nađenim u Europi te je ujedno opisan snažan fitotoksični učinak na germinaciju sjemenki bijele gorušice, *Sinapis alba* L., Brassicaceae. Također, brojne studije podupiru tezu da biljke izložene djelovanju alelokemikalija počinju povećano stvarati ROS-ove, odnosno induciran je oksidativni stres u stanicama (Gniazdowska i sur., 2015).

Ovaj diplomski rad se temelji na pretpostavci da će modelni organizam uslijed izloženosti alelokemikalijama prisutnim u ekstraktu vrste *I. glandulifera* započeti s hiperprodukcijom ROS-ova, odnosno da će alelokemikalije prisutne u ekstraktu vrste *I. glandulifera* u modelnom organizmu izazvati pojavu oksidacijskog stresa. Povećana razina oksidacijskog stresa u biljnome tkivu može uzrokovati promjene u razini biokemijskih parametara oksidacijskog stresa, a koje se mogu pratiti mjerenjem sadržaja GSH, antocijanina i MDA.

Za ispitivanje alelopatskog učinka vrste *I. glandulifera* u ovome je istraživanju kao modelni organizam odabrana bijela gorušica, *S. alba*. Istraživanje je provedeno tako da je prvo pripremljen metanolni ekstrakt lista vrste *I. glandulifera*, s kojim su u tri različite doze (1,5 ml, 3 ml i 6 ml) tijekom tri dana bile tretirane sjemenke vrste *S. alba*, a u istraživanje je uključena i skupina izložena destiliranoj vodi (negativna kontrola) i otopini  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  (pozitivna kontrola). Kako bi se ustvrdio fitotoksični učinak metanolnog ekstrakta vrste *I. glandulifera*, nakon tretmana odvagana je masa svježeg tkiva klijanaca. Parametri oksidacijskog stresa (kao mogućeg mehanizma fitotoksičnog učinka) izmjereni su spektrofotometrijski u homogenatu biljnog tkiva klijanaca. Antioksidacijski učinak određen je mjerenjem sadržaja GSH i antocijanina, a kao pokazatelj lipidne peroksidacije izmjeren je sadržaj MDA.

### **3. MATERIJALI I METODE**

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Kemikalije

Za pripremu otopina za tretman sjemenki bijele gorušice (*S. alba*) upotrijebljene su sljedeće kemikalije:

- metanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- bakrov (II) sulfat  $\text{CuSO}_4$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- deionizirana voda.

Za pripremu homogenata biljnog tkiva bijele gorušice upotrijebljena je:

- trikloroocetna kiselina, TCA (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Za određivanje sadržaja GSH u homogenatu biljnog tkiva bijele gorušice upotrijebljeni su:

- 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD),
- kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- kalijev hidrogenfosfat,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD).

Za određivanje sadržaja antocijanina u homogenatu biljnog tkiva bijele gorušice upotrijebljeni su:

- kalij-kloridni pufer pH 1 (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- natrij-acetatni pufer pH 4,5 (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Za određivanje sadržaja MDA u homogenatu biljnog tkiva bijele gorušice upotrijebljena je:

- 2-tiobarbituratna kiselina, TBA (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD).

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće. Za pripremu otopina korištena je destilirana voda.

### 3.1.2. Oprema

U istraživanju je korištena sljedeća oprema:

- mikropipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),

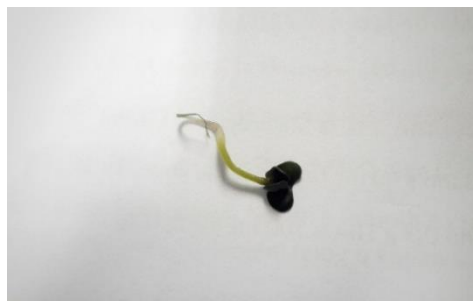
- UV-VIS spektrofotometar T70 (PG Instruments Ltd, Lutterworth, UK),
- miješalica, Vortex-Heidolph model REAX top (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka),
- centrifuga, Frontier 5706 (Ohaus, Greifensee, Švicarska),
- precizna analitička vaga PB303 Delta Range (Mettler Toledo, Columbus, SAD),
- termostat, TMA (Termo-medicinski aparati, Dugo selo, Hrvatska),
- kiveta, Open-top UV-quartz cell (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD),
- pH metar, HI 9025 (Hanna instruments, Woonsocket, SAD).

Navedeni uređaji nalaze se na Zavodu za Farmaceutsku botaniku Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

### 3.1.3. Biljni model

U ovome ispitivanju kao modelni organizam korištena je biljka bijela gorušica, *Sinapis alba* L. iz porodice Brassicaceae (slika 7). Bijela gorušica je jednogodišnja zeljasta biljka koja potječe iz područja Sredozemlja. Može se uzgajati, ali se nalazi i samonikla jer je klijavost sjemena vrlo uspješna na različitim vrstama tla (Grlić, 1990). Otporna je na niske temperature iako preferira toplija i sunčanija područja. Prednost ove biljne vrste je brzo klijanje na podlozi za što joj je potrebno svega par dana (3-4 dana). To je razlog zbog čega se u ovome istraživanju koristila kao modelna biljna vrsta, točnije vrsta na kojoj su vršena ispitivanja alelopatskog učinka invazivne biljne vrste.

Sjemenke bijele gorušice korištene u ovom istraživanju nabavljene su iz sjemenare Botaničkog vrta ljekovitog bilja „Fran Kušan” Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.



**Slika 7.** Klijanac bijele gorušice (*S. alba*) (slikala: K. Zelić).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Biološki pokus – germinacija

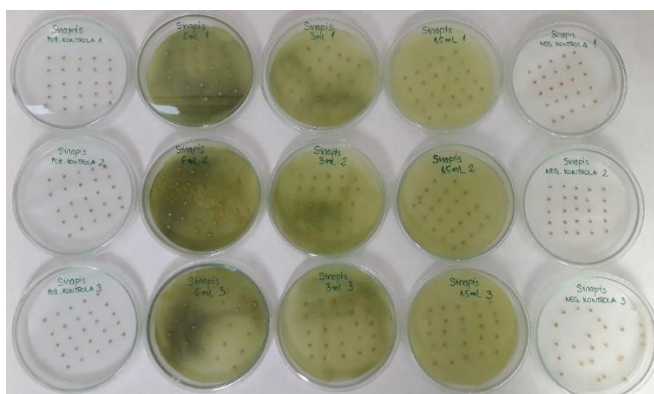
#### 3.2.1.1. Priprema otopina

Kako bi se ispitaio učinak žljezdastog nedirka na germinaciju (klijavost) i promjenu biokemijskih parametara klijanaca modelnog organizma (bijela gorušica) pripremljen je metanolni ekstrakt žljezdastog nedirka. Metanolni ekstrakt žljezdastog nedirka (*I. glandulifera*) priređen je ekstrakcijom iz 3,5 g suhe tvari u 100 ml metanola.

Kao pozitivna kontrola u ovome pokusu korištena je otopina 0,02 M  $\text{CuSO}_4$ . 0,02 M otopina  $\text{CuSO}_4$  pripremljena je tako da je odvagano 0,5 g  $\text{CuSO}_4$  te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 100 ml koja je nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

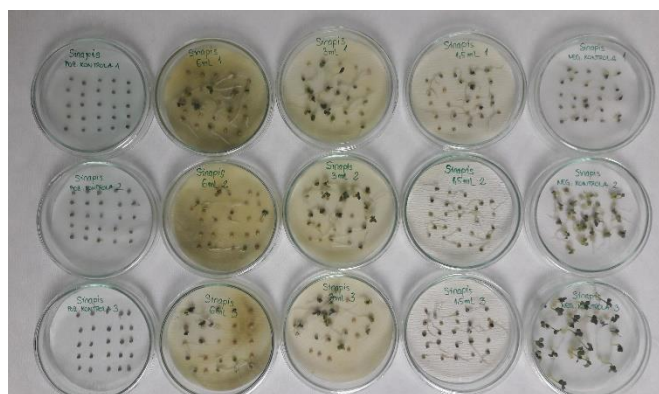
#### 3.2.1.2. Provođenje biološkog pokusa

Filtar papir u Petrijevim zdjelicama je impregniran s tri različite doze priređenog ekstrakta žljezdastog nedirka (1,5 ml; 3 ml i 6 ml). U pokus je uključena negativna kontrola (filtar papir impregniran s deioniziranom vodom) i pozitivna kontrola (impregnacija s 0,02 M  $\text{CuSO}_4$ ). Na klijanje je postavljeno u jednoj Petrijevoj zdjelici po 25 sjemenki bijele gorušice (*S. alba*) i ostavljeno na tamnom mjestu tri dana. Pokusi su provedeni u triplikatu kako je i vidljivo na slici 8.



**Slika 8.** Sjemenke bijele gorušice (*S. alba*) na početku pokusa klijanja (slikali: I. Duka i T. Vilović).

Tri dana nakon postavljenog pokusa klijanja odvagana je masa svježeg tkiva te su klijanci u označenim vrećicama pohranjeni na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do biokemijskih analiza. Slika 9 prikazuje klijance *S. alba* nakon tri dana klijanja.



**Slika 9.** Sjemenke bijele gorušice (*S. alba*) nakon 3 dana pokusa klijanja (slikali: I. Duka i T. Vilović).

### 3.2.1.3. Priprema homogenata tkiva za mjerenje biokemijskih parametara

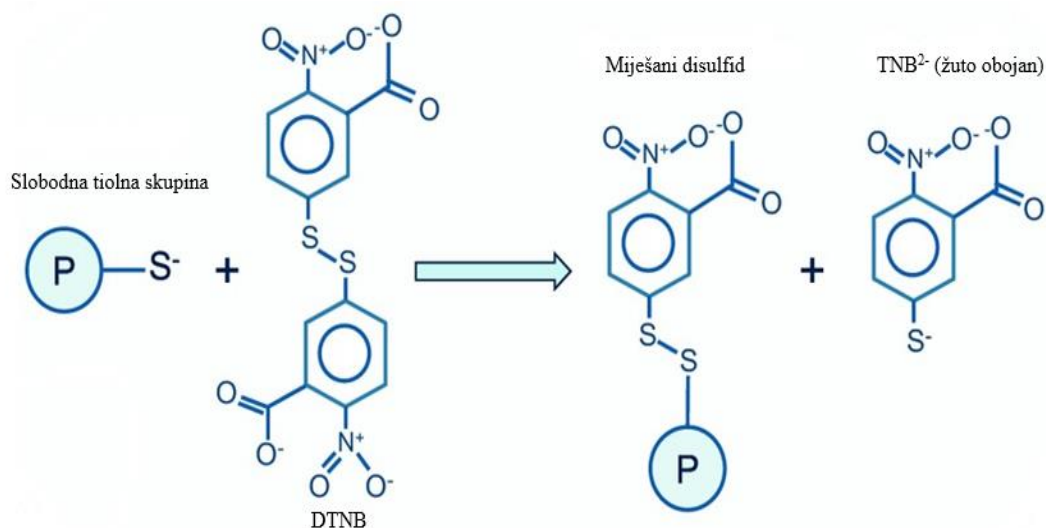
Na analitičkoj vagi je odvagana masa od 10 g TCA te kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 200 ml i nadopunjena s destiliranom vodom do oznake. Na taj način je dobiveno 200 ml 5 % TCA.

Homogenat biljnog tkiva bijele gorušice pripremljen je s 5 % TCA. Homogenat je pripremljen tako što je odvagano 100 mg biljnog tkiva te homogenizirano u 0,5 ml 5% TCA. To je učinjeno mehanički koristeći se tučkom u tarioniku. U tako pripremljenom homogenatu klijanaca vrste *S. alba* određen je sadržaj biokemijskih parametara (GSH, antocijanina i MDA) pomoću UV-VIS spektrofotometra.

## 3.2.2. Metoda određivanja GSH

### 3.2.2.1. Princip metode

Za određivanje pokazatelja antioksidacijskog statusa u homogenatu klijanaca vrste *S. alba* nakon tretmana s ekstraktom vrste *I. glandulifera* korištena je reakcija s Ellmanovim reagensom (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina, DTNB) prema metodi Ellman (1959). Reakcijom između tiolne skupine GSH i ostalih neproteinskih tiola s DTNB reagensom nastaju 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB) i miješani disulfidi (slika 10). Pri blago alkalnim uvjetima TNB prelazi u ionizirani oblik  $TNB^{2-}$  koji je žuto obojan. Intenzitet obojenja nastalog produkta mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 412 nm. Sadržaj neproteinskih tiola može se odrediti pomoću apsorpcijskog koeficijenta koji iznosi  $14150 M^{-1} cm^{-1}$ .



**Slika 10.** Reakcija DTNB i tiolne skupine te stvaranje žuto obojenog produkta TNB<sup>2-</sup> (preuzeto iz: Rudyk i Eaton, 2014. i prilagođeno).

### 3.2.2.2. Priprema otopina za određivanje GSH

#### Priprema 1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,4

Za izradu kalij-fosfatnog pufera korišteni su  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Prvo je bilo potrebno izračunati njihove molarne mase (M) iz periodnog sustava elemenata (PSE) te uz pomoć formule za množinu tvari ( $n = m / M$ ; n-množina tvari, m-masa tvari, M-molarna masa) dobiti masu tvari potrebnu za pripremu 1 M otopine. Prema izračunu je na preciznoj analitičkoj vagi za pripremu 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  odvagano 13,609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i prenijeto u odmjernu tikvicu od 100 ml te nadopunjeno s destiliranom vodom do oznake. 1 M otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  je pripremljena tako da je prethodno odvagano 17,418 g uzorka što je vrijednost dobivena prema formuli za množinu tvari. Ta količina tvari je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopunjena destiliranom vodom.

Za dobivanje puferske otopine traženog pH bilo je potrebno pomiješati 1 M otopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  uz pomoć pH metra kako bi što preciznije bio postignut traženi pH 7,4. Kalij-fosfatni pufer je medij korišten za izvođenje pokusa te otapalo. U pripremljenu otopinu pufera dodano je i 0,0037 g etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) potrebno da bi molaritet EDTA u otopini iznosio 0,1 mM. Primarna uloga EDTA je keliranje metala i na taj način posljedično sprječavanje autooksidacije GSH u uzorku. Potrebna masa EDTA je izračunata prema istoj formuli za množinu tvari te je na analitičkoj vagi izvagana i dodana u otopinu 100 ml 1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,4.



### Priprema 1 mM otopine DTNB-a

Za pripremu 1 mM otopine DTNB prema izračunu treba izvagati 0,00396 g tvari. Umjesto toga, pripremljena je 10 mM otopina jer je na taj način povećana preciznost odvage koja je u tom slučaju iznosila 0,0396 g DTNB. Ta odvaga je kvantitativno prenijeta u odmjernu tikvicu od 10 ml i do oznake nadopunjena otopinom 1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,4. Dobivena otopina je razrijeđena 10 puta kako bi se dobila 1 mM otopina DTNB-a. Ova otopina služi kao reagens u reakciji dokazivanja GSH.

#### **3.2.2.3. Postupak**

Homogenizirano biljno tkivo, kako je prethodno opisano (3.2.1.3.), je centrifugirano (10 minuta, 7000 RPM). Nakon centrifugiranja se 100 µl supernatanta homogenata pomiješa s 900 µl Ellmanovog reagensa. U pokusu je korištena slijepa proba reagensa koja sadrži 100 µl 5 % TCA i 900 µl Ellmanovog reagensa. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorci su prebačeni u kivetu te im je na valnoj duljini od 412 nm spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija. Sadržaj GSH izračunat je pomoću jednadžbe:

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

$$\text{Sadržaj GSH} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times l} \quad [\mu\text{M}]$$

gdje je:

$\Delta A$  – razlika izmjerene apsorbancije uzorka i slijepe probe na 412 nm

$\varepsilon$  – apsorpcijski koeficijent (14,15 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

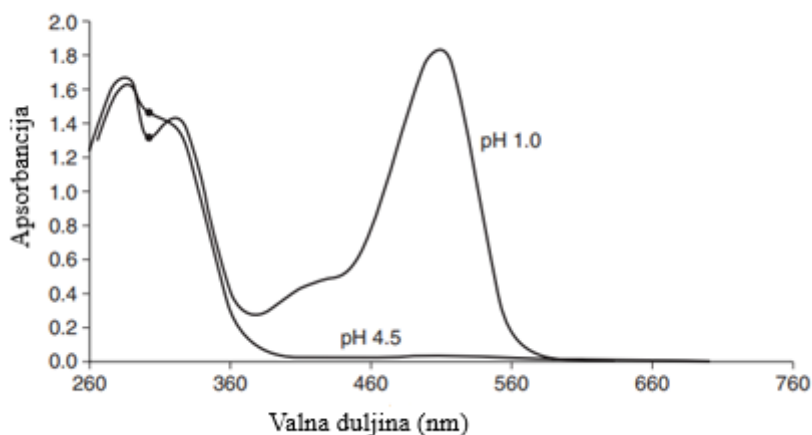
$l$  – dužina optičkog puta (1 cm)

### **3.2.3. Metoda određivanja antocijanina**

#### **3.2.3.1. Princip metode**

U ovome istraživanju sadržaj antocijanina određen je metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001). Ova metoda određivanja sadržaja antocijanina se temelji na strukturnoj transformaciji antocijaninskog kromofora kao funkciji pH koja se može mjeriti UV-VIS spektrofotometrom. Diferencijalna pH metoda mjeri apsorbancije dvije različite pH vrijednosti istoga uzorka. Promjenom pH vrijednosti pigment antocijanina reverzibilno mijenja strukturu

što je vidljivo i iz samog apsorpcijskog spektra (slika 11). Naime, u kiselom mediju (pH = 1,0) antocijanini se nalaze u obliku kationa i crvene su boje, a pri višem pH (pH = 4,5) se nalaze kao bezbojni hidratizirani oblici. Čak i u prisutnosti polimeriziranih, degradiranih pigmenta ova diferencijalna pH metoda je brza i pouzdane točnosti u mjerenju sadržaja ukupnih antocijanina. Uzorcima pH = 1,0 i pH = 4,5 izmjerena je apsorbanacija na valnoj duljini od 512 nm (apsorpcijski maksimum) i na valnoj duljini od 700 nm zbog korekcija zamućenja.



**Slika 11.** Acilirani pelargonidin-3-soforozid-5-glukozidni derivati u puferu pH 1,0 i pH 4,5 (preuzeto iz: Giusti i Wrolstad, 2001. i prilagođeno).

### 3.2.3.2. Postupak

Svaki uzorak je pripremljen u dvije serije uzoraka u duplikatu. U jednu seriju uzoraka dodana je pufer otopina pH = 1,0, a u drugu pufer otopina pH = 4,5. Svaka serija uzoraka pripremljena je miješanjem 200  $\mu$ l supernatanta homogenata vrste *S. alba* (nakon homogeniziranja s 5 % TCA opisano u 3.2.1.3. i centrifugiranja 10 minuta, 7000 RPM) i 800  $\mu$ l pufera. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 15 minuta. Nakon toga su prebačeni u kivetu te im je očitana apsorbanacija na dvije valne duljine: 512 nm i 700 nm. Sadržaj antocijanina je određen prema formuli:

$$\text{Sadržaj antocijanina} = \frac{(A \times M_r \times F_R \times 1000)}{\epsilon \times l} \quad [\text{mg/kg}]$$

gdje je:

A – apsorbanacija uzorka koja se računa prema izrazu:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

Mr – molekulska masa = 449,2

FR – faktor razrjeđenja

$\epsilon$  – apsorpcijski koeficijent (26 900 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

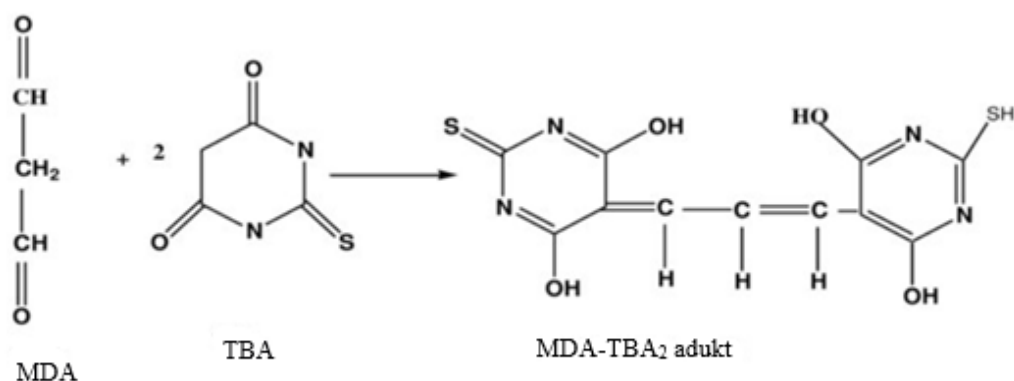
l – dužina optičkog puta (1 cm)

Podatci za vrijednost molekulske mase (Mr = 449,2) i ekstinkcijski koeficijent (26 900 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) su uzeti za cijanidin-3-glukozid, koji je najzastupljenija vrsta antocijanina.

### 3.2.4. Metoda određivanja MDA

#### 3.2.4.1. Princip metode

Metoda Heatha i Packera (1968), razvijena je za određivanje koncentracije malondialdehida (MDA), odnosno pokazatelja oksidacijskog oštećenja lipida u biljnome tkivu. U reakciji se koristi tiobarbituratna kiselina (TBA) pa se još metoda naziva i reakcija tiobarbituratnog testa. Reakcija se temelji na svojstvu molekule MDA koja u kiselim uvjetima i pri povišenoj temperaturi reakcijom nukleofilne adicije s TBA stvara crvenkasto obojeni kompleks (slika 12). Intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini od 532 nm. Također je bilo potrebno očitati apsorbanciju na 600 nm zbog mogućeg utjecaja nespecifičnog zamućenja.



**Slika 12.** Prikaz reakcije MDA i TBA te stvaranje crvenog kromogena MDA-TBA<sub>2</sub> (preuzeto iz: Ligor i sur., 2012. i prilagođeno)

### 3.2.4.2. Priprema otopina za određivanje MDA

#### Priprema 0,6 % otopine TBA

Za pripremu 0,6 % otopine TBA bilo je potrebno na analitičkoj vagi izvagati 0,6 g TBA te prenijeti u tikvicu od 100 ml i nadopuniti destiliranom vodom. Reakcija otapanja je potaknuta blagim zagrijavanjem na grijaču. Ova otopina služi kao reagens u tiobarbituratnom testu.

### 3.2.4.3. Postupak

Sadržaj MDA je određen u homogenatu klijanaca vrste *S. alba* pripremljenom u 5 % TCA te centrifugiranom (10 minuta, 7000 RPM) na način kao što je opisano u postupku pripreme homogenata (3.2.1.3.). U daljnjem pokusu pomiješano je 200  $\mu$ l supernatanta homogenata i 800  $\mu$ l 0,6 % otopine TBA. Slijepa proba sadržavala je 200  $\mu$ l destilirane vode i 800  $\mu$ l 0,6 % otopine TBA. Tako pripremljeni uzorci i slijepa proba su zagrijavani 30 minuta na temperaturi od 90 °C. Nakon pola sata epruvete su izvađene iz termostata i naglo ohlađene na ledu kako bi došlo do zaustavljanja reakcije. Prije samog mjerenja uzorci su još jednom centrifugirani (10 minuta na 7000 RPM) kako bi se uklonile moguće interferencije. Tako je iz bistrih uzoraka bilo moguće očitati apsorbanciju na UV-VIS spektrofotometru. Sadržaj MDA izračunat je pomoću formule za Beer-Lambertov zakon i poznate vrijednosti apsorpcijskog koeficijenta prema formuli:

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

$$\text{Sadržaj MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{\varepsilon \times l} \quad [\mu\text{M}]$$

gdje je:

$A_{532}$  – apsorbancija na 532 nm

$A_{600}$  – apsorbancija na 600 nm

$\varepsilon$  – apsorpcijski koeficijent (155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

$l$  – dužina optičkog puta (1 cm)

### 3.2.5. Statistička obrada rezultata

Modelni organizam (*S. alba*) tretiran je u triplikatu, a svi su biokemijski parametri (GSH, antocijanini, MDA) izmjereni za svaki od triplikata u duplikatu. Rezultati za masu

svježeg tkiva za svaki od tretmana prikazani su kao srednje vrijednosti triplikata  $\pm$  standardna devijacija, a biokemijski parametri kao srednje vrijednosti 6 replika  $\pm$  standardna devijacija. Pomoću korištenja t-testa u računalnom programu Excel napravljena je usporedba dobivenih rezultata između tretmana s destiliranom vodom (negativna kontrola) i ostalih tretmana za masu svježeg tkiva i za pojedini biokemijski parametar (GSH, antocijanini i MDA). Za statistički značajnu razliku postavljena je vrijednost  $P \leq 0,05$ .

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Biološki pokus utjecaja žljezdastog nedirka na promjenu biokemijskih parametara prilikom germinacije (klijavosti) bijele gorušice proveden je tako da su sjemenke bijele gorušice izložene različitim dozama metanolnog ekstrakta lista invazivne biljne vrste *I. glandulifera* (1,5 ml; 3 ml i 6 ml). U pokus su uključene i sjemenke bijele gorušice izložene deioniziranoj vodi (negativna kontrola; predstavlja normalne fiziološke uvjete klijanja) i otopini CuSO<sub>4</sub> (pozitivna kontrola). Bakar je široko rasprostranjen u okolišu i smatra se esencijalnim elementom za sva živa bića, uključujući i biljke. Ima ključnu ulogu u mnogim metaboličkim mehanizmima, no kada sadržaj bakra u tkivima postane veći od optimalnog pokazuje se njegova toksičnost (Verma i sur., 2011). Stoga je u ovom istraživanju 0,02 M otopina CuSO<sub>4</sub> korištena kao pozitivna kontrola. Nakon tri dana klijanja u opisanim uvjetima odvagana je masa svježeg tkiva klijanaca bijele gorušice te pripremljen homogenat za mjerenje sadržaja biokemijskih parametara GSH, antocijanina i MDA.

#### 4.1. Masa svježeg tkiva

U ovome istraživanju nakon tri dana klijanja u opisanim uvjetima odvagana je masa svježeg tkiva klijanaca bijele gorušice. Mjerenje mase svježeg tkiva u istraživanjima se smatra važnim zato što se vrijednost odvage svježeg tkiva izravno povezuje s rastom biljke (Yeoman i Macleod, 1977).

**Tablica 1.** Masa svježeg tkiva klijanaca bijele gorušice nakon 3-dnevne izloženosti metanolnom ekstraktu žljezdastog nedirka.

<i>Tretman</i>	<i>masa svježeg tkiva srednja vrijednost ± SD (g)</i>	<i>P</i>
negativna kontrola (izloženi deioniziranoj vodi)	0,610 ± 0,215	-
izloženi 1,5 ml ekstraktu žljezdastog nedirka	0,273 ± 0,038	0,057
izloženi 3 ml ekstraktu žljezdastog nedirka	0,423 ± 0,045	n.z.
izloženi 6 ml ekstraktu žljezdastog nedirka	0,399 ± 0,049	n.z.
pozitivna kontrola (izloženi 0,02 M CuSO <sub>4</sub> )	0,270 ± 0,033	0,055

n.z. – nije značajno

Kako je vidljivo iz tablice 1 masa svježeg tkiva u svim tretiranim klijanacima bijele gorušice je bila niža u odnosu na negativnu kontrolu ( $0,610 \pm 0,215$  g). Takvi rezultati su očekivani kod tretmana s deioniziranom vodom jer ti uvjeti predstavljaju normalne uvjete germinacije modelnog organizma. Najniža masa svježeg tkiva ( $0,270 \pm 0,033$ ;  $P = 0,055$ ) je izmjerena u uzorcima izloženima tri dana 0,02 M otopini  $\text{CuSO}_4$  koji je predstavljao pozitivnu kontrolu. U klijanaca bijele gorušice izloženih ekstraktu žljezdastog nendirka bilo je za očekivati da će tretman s najvišom dozom ekstrakta imati najveći inhibitorni učinak na germinaciju, tj. da će masa svježeg tkiva klijanaca biti najniža. No najnižu masu svježeg tkiva ( $0,273 \pm 0,038$  g) imao je uzorak tretiran s najnižom dozom ekstrakta (1,5 ml). To pokazuje da nisu dobiveni očekivani rezultati. Dobivene rezultate moguće je objasniti različitom klijavošću sjemenki bijele gorušice. Iako je za provođenje pokusa odabrana baš ova vrsta zbog svoje dobre klijavosti, ipak je moguće da nisu sve sjemenke isključale. Pokusi su provedeni u triplicatu te je iz vrijednosti standardne devijacije vidljivo da postoje odstupanja između jednako tretiranih uzoraka. Na vijabilnost sjemenki bijele gorušice nije bilo moguće utjecati. Vijabilnost označava da je sjemenka sposobna klijeti i proizvoditi normalne klijance te se taj pojam usko povezuje s kapacitetom germinacije (Copeland i McDonald, 2001).

## 4.2. GSH

Alelopatske sastavnice biljne vrste mogu izazvati sekundarni oksidacijski stres u druge biljne vrste koji se manifestira povećanom proizvodnjom reaktivnih kisikovih spojeva (ROS-ova). Za biljku je neophodno smanjiti razinu akumuliranih ROS-ova kako bi preživjela, a to postiže indukcijom raznih antioksidacijskih enzima i neenzimskih antioksidansa (Sahoo i sur., 2017). Reducirani glutation, GSH, predstavlja glavni antioksidans koji može sniziti razine ROS-ova. Stoga je u ovome istraživanju mjerena sadržaj GSH u klijanacima bijele gorušice koji su tri dana bili izloženi ekstraktu žljezdastog nendirka.

Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 2. Sadržaj GSH u homogenatu klijanaca bijele gorušice nakon 3-dnevne izloženosti metanolnom ekstraktu invazivne vrste bio je viši u odnosu na negativnu kontrolu. U uzorcima tretiranim s najnižom dozom metanolnog ekstrakta žljezdastog nendirka (1,5 ml) sadržaj GSH je bio značajno viši od negativne kontrole ( $12,956 \pm 1,050$   $\mu\text{M}$  vs.  $10,365 \pm 2,378$   $\mu\text{M}$ ;  $P < 0,05$ ). Također, i najviša doza metanolnog ekstrakta žljezdastog nendirka uzrokovala je značajni porast koncentracije GSH u homogenatu klijanaca bijele gorušice ( $13,404 \pm 0,716$   $\mu\text{M}$ ;  $P < 0,05$ ). Iako je bilo za očekivati da će tretman s dozom



od 3 ml ekstrakta invazivne vrste također doprinijeti većem sadržaju GSH u homogenatu klijanaca bijele gorušice, to nije zabilježeno. Dobiveni rezultat moguće je objasniti velikom standardnom devijacijom, odnosno većim odstupanjima između triplikata uzoraka tretiranih s 3 ml metanolnog ekstrakta invazivne vrste.

**Tablica 2.** Sadržaj GSH u homogenatu klijanaca bijele gorušice nakon 3-dnevne izloženosti metanolnom ekstraktu žljezdastog nendirka.

<i>tretman</i>	<i>sadržaj GSH</i> <i>srednja vrijednost ± SD (μM)</i>	<i>P</i>
negativna kontrola (izloženi deioniziranoj vodi)	10,365 ± 2,378	-
izloženi 1,5 ml ekstraktu žljezdastog nendirka	12,956 ± 1,050	0,035
izloženi 3 ml ekstraktu žljezdastog nendirka	11,166 ± 1,898	n.z.
izloženi 6 ml ekstraktu žljezdastog nendirka	13,404 ± 0,716	0,0134
pozitivna kontrola (izloženi 0,02 M CuSO <sub>4</sub> )	18,139 ± 1,678	6,522 x 10 <sup>-5</sup>

n.z. – nije značajno.

Zbog posjedovanja redoks-aktivne tiolne skupine GSH se smatra jednim od glavnih čimbenika u obrani biljaka protiv oksidativnog stresa. GSH se ponaša kao antioksidans reduciranjem ROS-ova te je uključen u askorbat-glutationski ciklus koji uklanja oštećene perokside. Biljke povećavaju aktivnost biosintetskih enzima GSH-a i razinu GSH kao odgovor na abiotski i biotski stres (Apel i Hirt, 2004). Alelopatija se smatra biotskim faktorom, tj. utjecajem jedne biljne vrste na drugu.

Literaturni navodi potvrđuju povezanost alelopatičkog učinka i povišene razine GSH u modelnom organizmu. Tako je u znanstvenom radu Huang i suradnika (2013) prikazan alelopatički učinak ekstrakta invazivne vrste *Solidago canadensis* L. na vrstu cijanobakterija *Microcystis aeruginosa*. U tom istraživanju u rezultatima pokusa navedeno je da je došlo do značajnog porasta u sadržaju dviju antioksidacijskih molekula, askorbatne kiseline i GSH prilikom svih tretmana te je njihov sadržaj u uzorcima rastao ovisno o koncentracijama

ekstrakta. U pokusima s alelokemikalijom etil-2-metil acetoacetatom (EMA) izoliranom iz trske (*Phragmites communis*) na vrsti cijanobakterije *Microcystis aeruginosa* također je zabilježen enzimski i neenzimski antioksidacijski odgovor. Rezultati su pokazali da se sadržaj GSH značajno povećao kao odgovor na tretman s EMA (Hong i sur., 2008). Rezultati sadržaja GSH u ovome istraživanju u skladnosti su s navedenim istraživanjima.

### 4.3. Antocijanini

Antocijanini se u prirodi nalaze u raznim oblicima. U ovome istraživanju određivani su antocijanini. Antocijanini su antocijani kojima se šećerna skupina nalazi na položaju 3 u prstenu C. U biljaka antocijanini imaju važnu ulogu u reprodukciji, ali su također važni u zaštiti od različitih abiotskih i biotskih stresova. Sadržaj antocijanina ovisi o ravnoteži između biosinteze i degradacije pigmenta (Liu i sur., 2018). U ovome istraživanju za određivanje ukupnog sadržaja antocijanina zbog svoje jednostavnosti korištena je metoda po Giusti i Wrolstad (2001). Za bolje razumijevanje rezultata trebalo bi još odrediti i degradirane antocijaninske produkte i antioksidacijsku aktivnost antocijanina.

**Tablica 3.** Sadržaj antocijanina u homogenatu klijanaca bijele gorušice nakon 3-dnevne izloženosti metanolnom ekstraktu žljezdastog nendirka.

<i>Tretman</i>	<i>sadržaj antocijanina srednja vrijednost ± SD (mg/kg)</i>	<i>P</i>
negativna kontrola (izloženi deioniziranoj vodi)	0,363 ± 0,042	-
izloženi 1,5 ml ekstraktu žljezdastog nendirka	0,409 ± 0,199	n.z.
izloženi 3 ml ekstraktu žljezdastog nendirka	0,434 ± 0,091	n.z.
izloženi 6 ml ekstraktu žljezdastog nendirka	0,125 ± 0,035	0,000123
pozitivna kontrola (izloženi 0,02 M CuSO <sub>4</sub> )	0,192 ± 0,078	0,008172

n.z. – nije značajno

Premda je u ovome istraživanju određen samo jedan parametar vezan uz antocijanine, ipak je na temelju prijašnjih znanstvenih spoznaja moguće izvesti zaključak o sadržaju antocijanina u homogenatu klijanaca. Naime, u radu Yang i suradnika (2019) opisana je korelacija između ukupnog sadržaja antocijanina i cijanidin-3-O-glukozida i antioksidacijske aktivnosti pročišćenih ekstrakata iz osam različitih pigmentiranih biljaka. Rezultati tog rada su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju između antioksidacijske aktivnosti i ukupnog sadržaja antocijanina. Stoga se iz navedenog može zaključiti da biljna vrsta koja posjeduje veći sadržaj antocijanina ima i veću antioksidacijsku aktivnost. Ista korelacija je potvrđena u znanstvenom članku Siti Azima i suradnika (2014) te je ustvrđeno da monomerni antocijanini imaju vrlo važnu ulogu u antioksidacijskoj aktivnosti jer upravo oni posjeduju labaviju strukturu zbog koje su podložniji oksidaciji za razliku od nemonomernih antocijanina. Također je prilikom izloženosti biljnih vrsta alelopatskom stresu zabilježen porast sadržaja antocijaninskog pigmenta (Bakhshayeshan-Agdam i Salehi-Lisar, 2020). Kako je vidljivo iz tablice 3 i u ovome istraživanju opažen je porast (iako ne statistički značajan) ukupnog sadržaja antocijanina u homogenatu klijanaca bijele gorušice izloženih 1,5 ml i 3 ml dozi ekstrakta invazivne vrste te se može pretpostaviti da je vjerojatno došlo do blage aktivacije antioksidacijske aktivnosti antocijanina u modelnom organizmu. Međutim, tretman s najvišom dozom ekstrakta (6 ml) i tretman s  $\text{CuSO}_4$  (pozitivna kontrola) doveo je do sniženja ukupnog sadržaja antocijanina. Tretman s najvišom dozom (6 ml) metanolnog ekstrakta žljezdastog nederka u homogenatu klijanaca bijele gorušice doveo je do statistički značajno nižeg sadržaja antocijanina u odnosu na uzorke koji su bili tretirani deioniziranom vodom ( $0,125 \pm 0,035$  mg/kg vs.  $0,363 \pm 0,042$  mg/kg;  $P < 0,05$ ). Jedno od mogućih objašnjenja ovoga rezultata bilo bi da uslijed povišene razine ROS-ova dolazi do oštećenja integriteta membrane stanica i poteškoća u odvijanju raznih bioloških procesa. Stoga postoji mogućnost da je gubitkom biosintetskog kapaciteta potaknuta aktivna degradacija antocijanina (Rehman i sur., 2017). Poznato je da oksidacijom raznih fenolnih supstrata posljedično dolazi do stvaranja kinona koji uzrokuju degradaciju antocijanina (Pang i sur., 2008; Pifferi i Cultrera, 1974).

U brojnim radovima koji su istraživali antioksidacijsku sposobnost antocijanina pokazan je njihov protektivni učinak na lipidnu peroksidaciju. Naime, antocijanini direktnim uklanjanjem ROS-ova smanjuju oštećenja u stanicama uzrokovana oksidacijskim stresom. Iz navedenog se može zaključiti da porast u sadržaju antocijanina može dovesti do snižavanja sadržaja MDA. Primjerice u znanstvenom članku Duan i suradnika (2008) ispitan je inhibitorski utjecaj antocijaninskog ekstrakta iz sjemene lupine crne soje (*Glycine max* L.) na lipidnu

peroksidaciju ličija (*Litchi chinensis* Sonn.) te je u usporedbi s kontrolom došlo do značajnog sniženja sadržaja MDA. Iz navedenog je jasno da antocijanini imaju dokazanu antioksidacijsku sposobnost te bitnu ulogu u uklanjanju slobodnih radikala. U ovome istraživanju njihov povišen sadržaj zabilježen je pri tretmanu s nižim dozama invazivne vrste, a tretman s najvišom dozom (6 ml) invazivne vrste uzrokovao je značajno sniženje sadržaja antocijanina što se može objasniti toksičnosti primijenjene više doze invazivne vrste.

#### 4.4. MDA

Lipidna peroksidacija posljedica je oksidativnog oštećenja staničnih lipida uzrokovanog ROS-ovima. U ovome istraživanju kao pokazatelj peroksidacije lipida izmjeren je sadržaj MDA u homogenatu klijanaca bijele gorušice nakon tretmana sjemenki ekstraktom žljezdastog nendirka.

**Tablica 4.** Sadržaj MDA u homogenatu klijanaca bijele gorušice nakon 3-dnevne izloženosti metanolnom ekstraktu žljezdastog nendirka.

<i>tretman</i>	<i>sadržaj MDA srednja vrijednost ± SD (μM)</i>	<i>P</i>
negativna kontrola (izloženi deioniziranoj vodi)	0,884 ± 0,325	-
izloženi 1,5 ml ekstraktu žljezdastog nendirka	0,415 ± 0,297	n.z.
izloženi 3 ml ekstraktu žljezdastog nendirka	0,568 ± 0,236	n.z.
izloženi 6 ml ekstraktu žljezdastog nendirka	0,617 ± 0,260	n.z.
pozitivna kontrola (izloženi 0,02 M CuSO <sub>4</sub> )	2,783 ± 0,523	0,00593

n.z. – nije značajno

Sadržaj MDA u klijanaca bijele gorušice nakon izloženosti ekstraktu žljezdastog nendirka nije se razlikovao od negativne kontrole ( $P > 0,05$ ), kako se može vidjeti iz prikaza u tablici 4. S druge strane tretman s otopinom 0,02 M CuSO<sub>4</sub> koji je služio kao pozitivna kontrola u ovome istraživanju doveo je do značajnog porasta koncentracije MDA ( $2,783 \pm 0,523 \mu\text{M}$ ;  $P$

< 0,05) u usporedbi s negativnom kontrolom ( $0,884 \pm 0,325 \mu\text{M}$ ). Zanimljivo je primijetiti da je u homogenatu klijanaca bijele gorušice došlo do sniženja sadržaja MDA, iako ne značajnog, nakon tretmana s ekstraktom invazivne vrste. Dobiveni rezultat je moguće objasniti činjenicom da je izloženost ekstraktu invazivne vrste dovela do porasta sadržaja GSH i antocijanina koji su moguće prevenirali nastajanje lipidne peroksidacije.

U ovome istraživanju sadržaj MDA određen je tiobarbituratnim testom spektrofotometrijski, a apsorbance su očitane i na 532 nm i na 600 nm (600 nm je korekcija zamućenja uzorka). U preglednom radu Grotto i suradnici (2009) iznose podatke o MDA kao značajnom biomarkeru lipidne peroksidacije te su diskutirane metode njegovog određivanja. Spektrofotometrijska metoda određivanja MDA u reakciji s TBA je kritizirana zbog nedovoljne osjetljivosti i specifičnosti. Stoga se boljim metodama za određivanje MDA smatraju kromatografske tehnike i HPLC. Dakako, to nužno ne znači da su u ovom pokusu bile prisutne interferencije između TBA i drugih staničnih komponenti. Poznato je da antocijanini u biljnom tkivu također mogu doprijeti apsorbanciji na 532 nm te na taj način mogu utjecati na povećanje izmjerenog sadržaja MDA (Hodges i sur., 1999). Međutim, u ovom pokusu ne dolazi do porasta u sadržaju MDA iz čega se može pretpostaviti da nisu postojale interferencije u reakciji tiobarbituratnog testa.

I druga istraživanja ispitivala su alelopatski učinak žljezdastog nendirka. Tako je u znanstvenom istraživanju Vrchotová i suradnika (2011) ispitan učinak vodenog, metanolnog i diklorometanskog ekstrakta iz listova različitih vrsta roda *Impatiens* (*I. noli-tangere* L., *I. parviflora* DC., *I. glandulifera* Royle) na germinaciju sjemenki bijele gorušice. Svi testirani ekstrakti su imali inhibitorni učinak na sjemenke bijele gorušice osim diklorometanskog ekstrakta. Najveći inhibitorni učinak imao je upravo metanolni ekstrakt vrste *I. glandulifera* koji je korišten i u ovom istraživanju. U navedenom pokusu metanolni ekstrakt vrste *I. glandulifera* priređen je iz 3,5 g suhe tvari u 80 ml metanola te je korištena samo jedna doza ekstrakta od 6 ml na filter papiru u Petrijevoj zdjelici. Slično kao i u ovom istraživanju na klijanje je postavljeno 30 sjemenki bijele gorušice. Rezultati tog istraživanja pokazali su snažan fitotoksični učinak tvari prisutnih u ekstraktu na germinaciju sjemenki bijele gorušice. Ti rezultati su u skladnosti s rezultatima ovoga istraživanja u kojem je primijećeno značajno sniženje mase svježeg tkiva klijanaca bijele gorušice nakon tretmana s metanolnim ekstraktom invazivne vrste. Fitotoksičnost žljezdastog nendirka može inhibirati germinaciju, ali i regeneraciju i regrutaciju susjednih vrsta u napadnutim staništima. Pokazana alelokemijska

fitotoksičnost žljezdastog nedirka se smatra djelomičnim objašnjenjem za njegovu visoku agresivnost.

Alelopatski učinak žljezdastog nedirka može se pripisati fenolima. U istraživanjima koje je provela Baležentienė (2018) zaključeno je da invazivne biljne vrste sadrže fenole koji djeluju fitotoksično na germinaciju modelnih biljaka i zaustavljaju rast klijanaca. Smatra se da su za invazivnost i fitotoksičan učinak žljezdastog nedirka zaslužni naftokinoni koji su široko rasprostranjene fenolne komponente u prirodi. U radu Ruckli i suradnika (2014) kvantificiran je sadržaj naftokinona u supki, listovima, stabljici i korijenu biljaka žljezdastog nedirka različite starosti uz pomoć UHPLC-MS. Rezultati su dokazali 2-metoksi-1,4-naftokinon (2-MNQ) u svim ispitivanim uzorcima, osim u supkama biljke. Koncentracija 2-MNQ (% suhe mase) u listovima žljezdastog nedirka je bila 10-15 puta veća nego u korijenu i stabljici te se smanjivala sa starošću biljke. Općenito se smatra da su kinoni zbog alelokemijskih svojstava toksični za okoliš.

Poput ostalih faktora stresa, alelokemikalije rezultiraju povećanom produkcijom ROS-ova, koji posljedično inhibiraju rast biljke. Provedena istraživanja u ovome diplomskom radu pokazuju da bi to mogao biti slučaj. Iako nisu izravno mjereni ROS-ovi (njih je teško izmjeriti zbog kratkog polu-života) izmjereni su pokazatelji oksidacijskog stresa, GSH, antocijanini i MDA. Povećan sadržaj GSH jasno potvrđuje prisustvo ROS-ova koji su potakli pojačanu sintezu GSH u klijancima bijele gorušice. Tretman s nižim dozama ekstrakta invazivne vrste uzrokovao je i neznatni porast sadržaja antocijanina što također potvrđuje aktivaciju antioksidacijske obrane. No tretman s najvišom dozom ekstrakta invazivne vrste doveo je do značajnog sniženja sadržaja antocijanina, što se može objasniti toksičnosti primijenjene doze. Aktivacija antioksidansa (izmjerena kao povećan sadržaj GSH i antocijanina u homogenatu klijanaca bijele gorušice) spriječila je pojavu lipidne peroksidacije te stoga u ovom istraživanju nije zabilježen porast sadržaja MDA u homogenatu klijanaca izloženih ekstraktu žljezdastog nedirka.

Odgovor nekog organizma na određenu tvar ili kemikaliju ovisi o dozi. Osnovni mehanizmi fitotoksičnosti se opisuju nelinearnom doza-učinak vezom. Odgovor biljaka na alelokemikalije kao biosintetizirane fitotoksine se kvantificira nelinearnim matematičkim modeliranjem. U članku Belz i suradnika (2005) je predstavljen koncept nelinearnosti određenih aspekata alelopatije te je taj princip ispitan na različitim alelokemikalijama. Iz tog je razloga u eksperimentu bilo bitno odrediti točnu koncentraciju i volumen ekstrakta koji sadrži alelokemikalije s kojima se tretira modelni organizam. U skladu s tim, rezultati ovog

istraživanja bi bili više relevantni da je određena točna koncentracija naftokinona u metanolnom ekstraktu invazivne biljke žljezdastog nedirka kojim su bile tretirane sjemenke bijele gorušice. No i bez tog podatka, a na temelju izmjerenih biokemijskih parametara i potvrđene inhibicije germinacije sjemenki modelnog organizma, moguće je zaključiti da je biljna vrsta *I. glandulifera* pokazala negativan alelopatski učinak na vrstu *S. alba*.

Za kraj treba imati na umu da je znanstveno područje koje se bavi alelopatijom relativno neistraženo te za mnoge alelokemikalije tek treba otkriti mehanizam djelovanja i utjecaj koji imaju na mikrokoliš. No sasvim je sigurno da će u budućnosti saznanja o ovoj prirodnoj pojavi naći svoju primjenu i to prvenstveno zbog pokazanog herbicidnog i nematocidnog učinka nekih izoliranih alelokemikalija (Zeman i sur., 2011).

## **5. ZAKLJUČCI**



Na temelju provedenog istraživanja utjecaja metanolnog ekstrakta vrste *I. glandulifera* na germinaciju i parametre oksidacijskog stresa modelnog organizma (*S. alba*) i usporedbe s dostupnom literaturom može se zaključiti sljedeće:

- Nakon 3-dnevne izloženosti metanolnom ekstraktu vrste *I. glandulifera* zabilježena je niža masa svježeg tkiva modelnog organizma (*S. alba*) te se može zaključiti da ekstrakt vrste *I. glandulifera* ima fitotoksičan učinak na germinaciju vrste *S. alba*.
- Blagi porast sadržaja neenzimskih antioksidansa, GSH i antocijanina, pokazuje da su alelokemikalije prisutne u vrsti *I. glandulifera* izazvale oksidacijski stres u modelnom organizmu.
- Značajan porast MDA, parametra koji je pokazatelj oksidacijskog oštećenja lipida, nije zabilježen te se može zaključiti da je aktivacijom antioksidacijskog obrambenog sustava modelnog organizma prevenirana lipidna peroksidacija.

Dobiveni rezultati potvrđuju fitotoksičan učinak vrste *I. glandulifera* koji se može pripisati prisustvu alelokemikalija, a poglavito naftokinonima. Na osnovu rezultata ovoga istraživanja može se pretpostaviti da je jedan od mehanizama fitotoksičnog učinka *I. glandulifera* oksidacijski stres.

## **6. LITERATURA**

- ❖ „nedirak“. U: *Hrvatska enciklopedija (mrežno izdanje)*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=43219>, pristupljeno 13. 8. 2020.
- ❖ Albuquerque M, Santos RC, Lima LM, Melo Filho PDA, Nogueira RJMC, Câmara C, i sur. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agron Sustain Dev*, 2011, 31(2), 379–395.
- ❖ Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55, 373-399.
- ❖ Bakhshayeshan-Agdam H, Salehi-Lisar SY. Agronomic Crops Response and Tolerance to Allelopathic Stress. U: *Agronomic Crops, Volume 3: Stress Responses and Tolerance*. Hasanuzzaman M, urednik, Singapur, Springer, 2020, str. 327.
- ❖ Baležentienė L. Phytotoxicity and allelopathic impact of *Impatiens glandulifera*. *Biologija*, 2018, 64(2), 153-159.
- ❖ Belz RG, Hurle K, Duke SO. Dose-Response-A Challenge for Allelopathy? *Nonlinearity Biol Toxicol Med*, 2005, 3(2), 173-211.
- ❖ Copeland LO, McDonald MB. Seed Viability and Viability Testing. U: *Principles of Seed Science and Technology*. Copeland LO, urednik, New York, Springer US, 2001, str. 124-139.
- ❖ Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot*, 2014, 109, 212-228.
- ❖ Duan X, Su X, Shi J, You Y, Zhao M, Li Y, Wang Y, Jiang Y. Inhibitory Effect Of Anthocyanin Extract From Seed Coat Of Black Bean On Pericarp Browning And Lipid Peroxidation Of Litchi Fruit During Storage. *J Food Biochem*, 2008, 32(4), 415-430.

- ❖ Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. U: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Wrolstad RE, Schwartz SJ, urednici, New York, John Wiley & Sons, Inc., 2001, Pogl. 1.2.1 – 1.2.13.
- ❖ Gniazdowska A, Krasuska U, Andrzejczak O, Soltys-Kalina D. Allelopathic Compounds as Oxidative Stress Agents: Yes or NO. U: *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants*. Gupta KJ, Igamberdiev AU, urednici, Cham, Springer International Publishing, 2015, str. 155 – 176.
- ❖ Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Zagreb, August Cesarec, 1990, str. 141.
- ❖ Grotto D, Santa Maria L, Valentini J i sur. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Quim Nova*, 2009, 32(1), 169-174.
- ❖ Haig T. Allelochemicals in Plants. U: *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*. Zeng RS, Mallik AU, Luo S, urednici, New York, Springer-Verlag, 2008, str. 63-104.
- ❖ Hodges D, DeLong J, Forney C, Prange R. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substance assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999, 207(4), 604-611.
- ❖ Hong Y, Hong-Ying H, Xing X, Feng-Min L. Responses of enzymatic antioxidants and non-enzymatic antioxidants in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to the allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from reed (*Phragmites communis*). *J Plant Physiol*, 2008, 165(12), 1264-1273.
- ❖ Huang Y, Bai Y, Wang Y, Kong H. Allelopathic effects of the extracts from an invasive species *Solidago canadensis* L. on *Microcystis aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol*, 2013, 57(5), 451-458.

- ❖ Ligor M, Olszowy P, Buszewski B. Application of medical and analytical methods in Lyme borreliosis monitoring. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(7), 2233-2248.
- ❖ Liu Y, Tikunov Y, Schouten RE, Marcelis LFM, Visser RGF, Bovy A. Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. *Front Chem*, 2018, 6, 52.
- ❖ Marković Lj. Prilozi neofitskoj flori savskih obala u Hrvatskoj. *Acta Bot Croat*, 1970, 29(1), 203-211.
- ❖ Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(9), 405-410.
- ❖ Nikolić T, Mitić B, Boršić I. Flora Hrvatske - invazivne biljke. Zagreb, Alfa, 2014, str. 190-193.
- ❖ Nikolić T. Sistematska botanika - raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Zagreb, Alfa, 2013, str. 390.
- ❖ Nikolić T. ur. Flora Croatica baza podataka, 2015., <http://hirc.botanic.hr/fcd>, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, pristupljeno 22. 7. 2020.
- ❖ Pandhair V, Sekhon BS. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Plants: An Overview. *J Plant Biochem Biotechnol*, 2013, 15, 71-78.
- ❖ Pang X, Huang X, Yang X, Ji Z, Zhang Z. Role of Polyphenol Oxidase in Anthocyanin Degradation of Lychee Pericarp. *Sci Agric Sin.*, 2008, 41, 540-545.
- ❖ Pifferi PG, Cultrera R. Enzymatic degradation of anthocyanins: The role of sweet cherry polyphenol oxidase. *J Food Sci*, 1974, 39, 786-791.
- ❖ Rehman RNU, You Y, Zhang L, Goudia BD, Khan AR, Li P, Ma F. High Temperature Induced Anthocyanin Inhibition and Active Degradation in *Malus profusion*. *Front Plant Sci*, 2017, 8, 1401.

- ❖ Ruckli R, Hesse K, Glauser G, Rusterholz HP, Baur B. Inhibitory Potential of Naphthoquinones Leached from Leaves and Exuded from Roots of the Invasive Plant *Impatiens glandulifera*. *J Chem Ecol*, 2014, 40(4), 371-378.
- ❖ Rudyk O, Eaton P. Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox biol*, 2014, 13(2), 803-813.
- ❖ Sahoo S, Awasthi JP, Sunkar R, Panda SK. Determining Glutathione Levels in Plants. U: *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*. Sunkar R, urednik, New York, Humana Press, 2017, str. 273-277.
- ❖ Sharma, P, Jha AB, Dubey RS Pessaraki M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot*, 2012, (2012), 1-26.
- ❖ Siti Azima AM, Noriham A, Manshoor N. Anthocyanin content in relation to the antioxidant activity and colour properties of *Garcinia mangostana* peel, *Syzigium cumini* and *Clitoria ternatea* extracts. *Int Food Res J*, 2014, 21(6), 2369-2375.
- ❖ Szöllősi R. Superoxide Dismutase (SOD) and Abiotic Stress Tolerance in Plants: An Overview. U: *Oxidative Damage to Plants - Antioxidant Networks and Signaling*. Ahmad P, urednik, San Diego, Elsevier Inc., 2014, str. 91-94.
- ❖ Verma JP, Singh V, Yadav J. Effect of Copper Sulphate on Seed Germination, Plant Growth and Peroxidase Activity of Mung Bean (*Vigna radiata*). *Int J Botany*, 2011, 7, 200-204.
- ❖ Vrchotová N, Šerá B, Krejčová J. Allelopathic activity of extracts from *Impatiens* species. *Plant Soil Environ*, 2011, 57(2), 57-60.
- ❖ Vukadinović V, Jug I, Đurđević B. Ekofiziologija bilja. Osijek, Sveučilišni udžbenik, naklada NSS, 2014, str. 11-33.

- ❖ Waškiewicz A, Gładys O, Szentner K, Goliriski P. Role of Glutathione in Abiotic Stress Tolerance. U: *Oxidative Damage to Plants - Antioxidant Networks and Signaling*. Ahmad P, urednik, San Diego, Elsevier Inc., 2014, str. 151-157.
  
- ❖ Willis RJ. *The History of Allelopathy*. Dordrecht, Springer Netherlands, 2007, str. 1-6.
  
- ❖ Yang L, Rong-Rong C, Ji-Li F, Ke Y. Total anthocyanins and cyanidin-3-O-glucoside contents and antioxidant activities of purified extracts from eight different pigmented plants. *Phcog Mag*, 2019, 15, 124-129.
  
- ❖ Yeoman MM, Macleod AJ. *Tissue (Callus) Cultures – Techniques*. U: *Plant tissue and cell culture (Botanical monographs, Vol. 11)*. Street HE, urednik, Berkeley, Blackwell Scientific, 1977, str. 51.
  
- ❖ Zeman S, Fruk G, Jemrić T. Alelopatski odnosi biljaka: pregled djelujućih čimbenika i mogućnost primjene. *Glasnik Zaštite Bilja*, 2011, 34 (4), 52-59.

## **7. SAŽETAK / SUMMARY**



## Sažetak

U ovom radu ispitan je učinak metanolnog ekstrakta žljezdastog nedirka (*Impatiens glandulifera* Royle, Balsaminaceae) na germinaciju sjemenki i parametre oksidacijskog stresa u klijancima bijele gorušice (*Sinapis alba* L., Brassicaceae). Sjemenke vrste *S. alba* tijekom tri dana bile su izložene metanolnom ekstraktu lista vrste *I. glandulifera* kojim je impregniran filter papir u tri različite doze (1,5; 3 i 6 mL). U pokus je uključena negativna kontrola (filter papir impregniran s deioniziranom vodom) i pozitivna kontrola (impregnacija s 0,02 M CuSO<sub>4</sub>). Pokusi su provedeni u triplicatu te je nakon 3-dnevne izloženosti odvagana masa svježeg tkiva klijanaca bijele gorušice. Homogenat biljnoga tkiva pripremljen je s trikloroocetnom kiselinom (100 mg tkiva/0,5 mL TCA). U supernatantu je izmjeren sadržaj reduciranog glutationa (GSH), antocijanina i malondialdehida (MDA). Sadržaj GSH izmjeren je prema Ellmanu (Ellman, 1959), sadržaj antocijanina određen je pH-diferencijalnom metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001), a sadržaj MDA pomoću tiobarbituratnog testa (Heath i Packer, 1968). Dobiveni rezultati obrađeni su statistički (t-test;  $P < 0,05$ ).

Masa svježeg tkiva u svim tretiranim klijancima bijele gorušice je bila niža u odnosu na negativnu kontrolu. Sadržaj GSH u tretiranim klijancima vrste *S. alba* bio je viši u odnosu na negativnu kontrolu te je u uzorcima tretiranim sa 6 mL ekstrakta vrste *I. glandulifera* bio značajno viši od negativne kontrole ( $13,404 \pm 0,716 \mu\text{M}$  vs.  $10,365 \pm 2,378 \mu\text{M}$ ;  $P < 0,05$ ). Tretman s ekstraktom vrste *I. glandulifera* uzrokovao je blagi rast u sadržaju antocijanina kod tretmana s 1,5 i 3 mL ekstrakta, iako je izloženost najvišoj dozi dovela do statistički značajno nižeg sadržaja antocijanina u odnosu na negativnu kontrolu ( $0,125 \pm 0,035 \text{ mg/kg}$  vs.  $0,363 \pm 0,042 \text{ mg/kg}$ ;  $P < 0,05$ ). Sadržaj MDA u tretiranim klijancima vrste *S. alba* nije se razlikovao od negativne kontrole. Dobiveni rezultati potvrđuju fitotoksičan učinak vrste *I. glandulifera*, a na temelju promjena u sadržaju GSH i antocijanina može se zaključiti da je u klijancima bijele gorušice ekstrakt *I. glandulifera* izazvao oksidacijski stres.

## Summary

In this thesis, the effect of methanol extract from himalayan balsam (*Impatiens glandulifera* Royle, Balsaminaceae) was tested on seed germination and oxidative stress parameters in white mustard seedlings (*Sinapis alba* L., Brassicaceae). Seeds of *S. alba* were exposed to methanol extract from *I. glandulifera* leaves (filter papers were impregnated with three different doses of methanol extract: 1.5; 3 and 6 mL) for three days. A negative control (filter paper impregnated with deionized water) and a positive control (impregnation with 0.02 M CuSO<sub>4</sub>) were included in the experiment. Experiments were performed in triplicate. After 3-day exposure, the fresh mass of white mustard seedlings was weighed. Plant tissue homogenate was prepared with trichloroacetic acid (100 mg tissue/0.5 mL TCA). Reduced glutathione (GSH), anthocyanin and malondialdehyde (MDA) content was assessed in the supernatant. The GSH content was measured according to the method of Ellman (Ellman, 1959). The anthocyanin content was determined by pH-differential method according to Giusti and Wrolstad (2001), while the MDA content was determined by using the thiobarbituric test (Heath and Packer, 1968). The obtained results were statistically analysed (t-test;  $P < 0.05$ ).

The fresh mass weight of all treated white mustard seedlings was lower compared to the negative control. The GSH content in treated seedlings of *S. alba* was higher compared to the negative control, and in samples treated with 6 mL of extract of *I. glandulifera* it was significantly higher than the negative control ( $13.404 \pm 0.716 \mu\text{M}$  vs.  $10.365 \pm 2.378 \mu\text{M}$ ;  $P < 0.05$ ). Treatment with extract of *I. glandulifera* (doses 1.5 and 3 mL) produced a slight increase in the anthocyanin content, although the exposure to the highest dose (6 mL) resulted in a statistically significantly lower anthocyanin content compared to the negative control ( $0.125 \pm 0.035 \text{ mg/kg}$  vs.  $0.363 \pm 0.042 \text{ mg/kg}$ ;  $P < 0.05$ ). The MDA content in treated seedlings of *S. alba* did not differ from the negative control. The obtained results confirm the phytotoxic effect of *I. glandulifera*, and moreover, based on changes in GSH and anthocyanin content it can be concluded that extract of *I. glandulifera* caused oxidative stress in white mustard seedlings.

## **8. PRILOG**

## Popis kratica

ATP - adenzin trifosfat

CAT - katalaza

Cu/Zn-SOD - bakar/cink superoksid dismutaza

DIBOA - 2, 4-dihidroksi-2H-1, 4-benzoksazin-3-on

DIMBOA - 2, 4-dihidroksi-7-metoksi-2H-1, 4-benzoksazin-3-on

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

DTNB - 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

EMA - etil-2-metil acetoacetat

Fe-SOD - željezo superoksid dismutaza

GGT -  $\gamma$ -glutamiltransferaza

GPx - glutation peroksidaza

GSH - reducirani glutation

GSSG - oksidirani glutation

HPLC - visokodjelotvorna tekućinska kromatografija

MDA - malondialdehid

MNQ - 2-metoksi-1,4-naftokinon

Mn-SOD - mangan superoksid dismutaza

PSE - periodni sustav elemenata

PUFA - polinezasićene masne kiseline

PX - peroksidaza

ROS - reaktivni kisikovi spojevi

RPM - okretaji u minuti

SOD - superoksid dismutaza

TBA - 2-tiobarbituratna kiselina

TCA - trikloroetena kiselina

UHPLC-MS - tekućinska kromatografija ultra visokog učinka s masenom spektrometrijom

**9. TEMELJNA  
DOKUMENTACIJSKA KARTICA/  
BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku botaniku  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Alelopatski učinak žljezdastog nedirka (*Impatiens glandulifera* Royle) na bijelu gorušicu (*Sinapis alba* L.)

Katarina Zelić

#### SAŽETAK

U ovom radu ispitan je učinak metanolnog ekstrakta žljezdastog nedirka (*Impatiens glandulifera* Royle, Balsaminaceae) na germinaciju sjemenki i parametre oksidacijskog stresa u klijancima bijele gorušice (*Sinapis alba* L., Brassicaceae). Sjemenke vrste *S. alba* tijekom tri dana bile su izložene metanolnom ekstraktu lista vrste *I. glandulifera* kojim je impregniran filtar papir u tri različite doze (1,5; 3 i 6 mL). U pokus je uključena negativna kontrola (filtrar papir impregniran s deioniziranom vodom) i pozitivna kontrola (impregnacija s 0,02 M CuSO<sub>4</sub>). Pokusi su provedeni u triplikatu te je nakon 3-dnevne izloženosti odvagana masa svježeg tkiva klijanaca bijele gorušice. Homogenat biljnoga tkiva pripremljen je s trikloroocetnom kiselinom (100 mg tkiva/0,5 mL TCA). U supernatantu je izmjeren sadržaj reduciranog glutationa (GSH), antocijanina i malondialdehida (MDA). Sadržaj GSH izmjeren je prema Ellmanu (Ellman, 1959), sadržaj antocijanina određen je pH-diferencijalnom metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001), a sadržaj MDA pomoću tiobarbituratnog testa (Heath i Packer, 1968). Dobiveni rezultati obrađeni su statistički (t-test;  $P < 0,05$ ). Masa svježeg tkiva u svim tretiranim klijancima bijele gorušice je bila niža u odnosu na negativnu kontrolu. Sadržaj GSH u tretiranim klijancima vrste *S. alba* bio je viši u odnosu na negativnu kontrolu te je u uzorcima tretiranim sa 6 mL ekstrakta vrste *I. glandulifera* bio značajno viši od negativne kontrole ( $13,404 \pm 0,716 \mu\text{M}$  vs.  $10,365 \pm 2,378 \mu\text{M}$ ;  $P < 0,05$ ). Tretman s ekstraktom vrste *I. glandulifera* uzrokovao je blagi rast u sadržaju antocijanina kod tretmana s 1,5 i 3 mL ekstrakta, iako je izloženost najvišoj dozi dovela do statistički značajno nižeg sadržaja antocijanina u odnosu na negativnu kontrolu ( $0,125 \pm 0,035 \text{ mg/kg}$  vs.  $0,363 \pm 0,042 \text{ mg/kg}$ ;  $P < 0,05$ ). Sadržaj MDA u tretiranim klijancima vrste *S. alba* nije se razlikovao od negativne kontrole. Dobiveni rezultati potvrđuju fitotoksičan učinak vrste *I. glandulifera*, a na temelju promjena u sadržaju GSH i antocijanina može se zaključiti da je u klijancima bijele gorušice ekstrakt *I. glandulifera* izazvao oksidacijski stres.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 48 stranica, 12 grafičkih prikaza, 4 tablice i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Žljezdasti nedirak, alelopatija, oksidacijski stres

Mentor: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Botany  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **Allelopathic effect of himalayan balsam (*Impatiens glandulifera* Royle) on white mustard (*Sinapis alba* L.)**

**Katarina Zelić**

#### **SUMMARY**

In this thesis, the effect of methanol extract from himalayan balsam (*Impatiens glandulifera* Royle, Balsaminaceae) was tested on seed germination and oxidative stress parameters in white mustard seedlings (*Sinapis alba* L., Brassicaceae). Seeds of *S. alba* were exposed to methanol extract from *I. glandulifera* leaves (filter papers were impregnated with three different doses of methanol extract: 1.5; 3 and 6 mL) for three days. A negative control (filter paper impregnated with deionized water) and a positive control (impregnation with 0.02 M CuSO<sub>4</sub>) were included in the experiment. Experiments were performed in triplicate. After 3-day exposure, the fresh mass of white mustard seedlings was weighed. Plant tissue homogenate was prepared with trichloroacetic acid (100 mg tissue/0.5 mL TCA). Reduced glutathione (GSH), anthocyanin and malondialdehyde (MDA) content was assessed in the supernatant. The GSH content was measured according to the method of Ellman (Ellman, 1959). The anthocyanin content was determined by pH-differential method according to Giusti and Wrolstad (2001), while the MDA content was determined by using the thiobarbituric test (Heath and Packer, 1968). The obtained results were statistically analysed (t-test;  $P < 0.05$ ). The fresh mass weight of all treated white mustard seedlings was lower compared to the negative control. The GSH content in treated seedlings of *S. alba* was higher compared to the negative control, and in samples treated with 6 mL of extract of *I. glandulifera* it was significantly higher than the negative control ( $13.404 \pm 0.716 \mu\text{M}$  vs.  $10.365 \pm 2.378 \mu\text{M}$ ;  $P < 0.05$ ). Treatment with extract of *I. glandulifera* (doses 1.5 and 3 mL) produced a slight increase in the anthocyanin content, although the exposure to the highest dose (6 mL) resulted in a statistically significantly lower anthocyanin content compared to the negative control ( $0.125 \pm 0.035 \text{ mg/kg}$  vs.  $0.363 \pm 0.042 \text{ mg/kg}$ ;  $P < 0.05$ ). The MDA content in treated seedlings of *S. alba* did not differ from the negative control. The obtained results confirm the phytotoxic effect of *I. glandulifera*, and moreover, based on changes in GSH and anthocyanin content it can be concluded that extract of *I. glandulifera* caused oxidative stress in white mustard seedlings.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 48 pages, 12 figures, 4 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Himalayan balsam, allelopathy, oxidative stress

Mentor: **Ana-Marija Domijan, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.



