



Oksidativni stres u sadnicama korova klasače (*Bromus mollis* L.) tretiranim vodenim ekstraktom *Satureja montana* L.

Jovana Šučur*, Dejan Prvulović, Đorđe Malenčić

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija

*Autor za kontakt: jovana.sucur@polj.edu.rs

SAŽETAK

Upotreba sintetičkih pesticida može imati negativan efekat na životnu sredinu, kao i na zdravlje ljudi i životinja. Poznavanje alelopatskih interakcija može da obezbedi efikasniji način eksploatacije prirodnih resursa u suzbijanju korova sa smanjenom upotrebom sintetičkih herbicida. U ovom radu ispitan je uticaj dve koncentracije (0,1% i 0,2%) vodenog ekstrakta *S. montana* na aktivnost antioksidantnih enzima superoksid-dismutaze i katalaze u listu i korenu klasače (*Bromus mollis* L.). Dobijeni rezultati su pokazali statistički značajno povećanje aktivnosti enzima superoksid-dismutaze u listu i korenu klasače. Statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze uočeno je u korenu klasače, koji se pokazao osetljiviji prema vodenom ekstraktu *S. montana*. Povećanje aktivnosti antioksidantnih enzima, kao odgovor na stres prouzrokovan vodenim ekstraktom *S. montana*, pokazuje da ekstrakt poseduje alelopatski uticaj na tretiranu biljku.

KLJUČNE REČI

Alelopatija, *Bromus mollis* L., *Satureja montana* L.

Uvod

Biljke sintetišu veliki broj sekundarnih biomolekula koji su prisutni u gotovo svim organima (listu, cvetu, plodu, stabljiki, korenu, semenu). Sintetisane biomolekule biljke emituju u spoljašnju sredinu preko eksudata iz korena, evaporacijom iz nadzemnih delova ili raspadanjem otpalih, izumrlih delova, i preko njih deluju na klijanje, rast i razvoj biljaka u okruženju, tako što utiču na njihovu fotosintezu, respiraciju, balans vode i hormona, aktivnost enzima kao i na strukturu i permeabilnost ćelijske membrane (An et al., 2003; Gatti et al., 2010). Supstance preko kojih se ostvaruju alelopatske interakcije između biljaka zovu se alelohemikalije (Bhadoria, 2011). To su sekundarni ili, ređe, primarni proizvodi metabolizma biljaka (Chou, 2006; Liu et al., 2013), sintetisani u acetogeninskom, šikimatnom ili izoprenoidnom putu, koji nemaju veliku ulogu u primarnom metabolizmu važnom za preživljavanje samih vrsta (Kovačević and Momirović, 2000). Značajan su faktor u hemijskim interakcijama između biljaka i patogena (Wójcicka, 2010). Najčešće vidljive promene koje se javljaju kao posledica alelopatskih interakcija su inhibicija ili retardacija klijanja semena, inhibicija rasta korenovog sistema, pucanje korenčića, nedostatak korenskih dlačica, izduživanje koleoptila i dr. (Bhadoria, 2011; Gella et al., 2013). Jedan od alelohemijskih efekata koji dovodi do ćelijske smrti jeste i povećana produkcija i akumulacija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) (Weir et al., 2004; Gniazdowska and Bogatek, 2005). Povećana produkcija reaktivnih vrsta kiseonika može da dovede do povećane aktivnosti enzima antioksidativnog odgovora (Mandal et al., 2013), koji imaju važnu ulogu da ublaže oksidativni stres (Gniazdowska and Bogatek, 2005; De Albuquerque et al., 2011). Oksidativni stres izazvan alelohemikalijama dovodi i do povećanja intenziteta lipidne peroksidacije ćelijskih membrana, čime se narušava integritet membrana i aktivan transport kroz njih (Li et al., 2013; Bogatek and Gniazdowska, 2007; Ding et al., 2007).

Najveći broj istraživanja u oblastima alelopatije su do sada bila fokusirana na probleme suzbijanja korova na pirinčanim poljima, zbog specifičnog načina gajenja ove ratarske kulture (Janjić et al., 2008). Identifikovane potencijalne alelohemikalije u ekstraktima i eksudatima pirinča pripadaju različitim klasama jedinjenja. U vodenim ekstraktima su identifikovane fenolne kiseline: *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, *p*-kumarinska i ferulna kiselina. Međutim, iako se smatra da fenolne kiseline, u poređenju sa ostalim klasama jedinjenja, imaju vodeću ulogu u alelopatiji utvrđeno je da je diterpenoid momilakton B u pirinču najznačajnije jedinjenje koje alelopatski deluje na korove (Kato-Noguchi and Ino, 2003; Kato-Noguchi, 2004; Kato-Noguchi and Ino, 2005; Kato-Noguchi and Ino, 2005).

Upravo se toksičnost hinona i fenola objašnjava formiranjem semihinon-radikala, donora elektrona molekulu kiseonika koji na taj način prelazi u superoksid-radikal (Weir et al., 2004). U poljoprivrednim sistemima interakcije između gajenih kultura, kao i interakcije između useva i korova, mogu da dovedu do smanjene produktivnosti (Dmitrović, 2012). Iz ovih činjenica je proizašla ideja o alelopatiji kao perspektivnoj strategiji za kontrolu korova u cilju smanjenja upotrebe sintetičkih herbicida i drugih pesticida koji zagađuju vazduh i zemljište (Akbarzadeh et al., 2013).

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje alelopatiskog delovanja dve koncentracije (0,1 i 0,2 %) vodenog ekstrakata biljke *Satureja montana* L. (Lamiaceae) na korov klasaču (*Bromus mollis* L.). određivanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid-dizmutaze i katalaze) u listu i korenu tretiranih biljaka.

Material i metod rada

Biljni materijal i priprema ekstrakta

Biljni materijal sakupljen je na području Crne Gore. Prilikom prikupljanja, biljke su se nalazile u fazi cvetanja. Pregledan je i kolektovan u Kolekciji primeraka jemstva (Voucher collection) Herbariuma BUNS. Determinaciju je izvršio dr Goran Anačkov, vanredni profesor na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Pripremljen biljni materijal je osušen na vazduhu. U Tabeli 1. prikazani su osnovni podaci o broju vaučera, lokalitetu i datumu sakupljanja ispitivane vrste.

Tabela 1

Geografska lokacija područja na kojima je sakupljen uzorak

Table 1

Geographical location of the sample areas

Broj vaučera	Vrsta	Lokalitet	Datum
2-1544	<i>Satureja montana</i> L.	Crna Gora	krečnjački
	1753 subsp. <i>Montana</i>	Podgorica, Bioče, kamenjar, Potoci	pseudomakija
		N 42.32.23,21;	
		E 19.20.02,17;	
		123 m	Jun 2012.

Odmereno je 0,15 g osušenog i prethodno usitnjenog biljnog materijala, i potom ekstrahovano vodom (15 ml). Nakon 24 h macerat je proceđen kroz Büchner-ov levak. Napravljen je osnovni 10% vodeni ekstrakt od kojeg su pravljena razblaženja korišćena u daljem radu (0,1 i 0,2%). Ekstrakt je čuvan u frižideru na temperaturi od +4 °C.

Ispitivanje alelopatiskog potencijala vodenog ekstrakta

Za ispitivanje alelopatiskog potencijala vodenog ekstrakata *S. montana*, kao test biljka, korišćen je korov klasača (*Bromus mollis* L.).

Priprema sadnica

Semena su površinski sterilisana potapanjem u 10% H₂O₂ na 3 minuta, zatim su ispirana destilovanom vodom nekoliko puta. Uniformno klijanje je dobijeno na vlažnom pesku pod kontrolisanim uslovima: 28 °C, relativna vlažnost vazduha 60%, fotoperiod od 18 h, i osvetljenost od 10 000 lx. Nakon 15 dana sadnice su prenete u plastične kutije sa Hoglandovim rastvorom (10% MgSO₄ x 7H₂O, 10% Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 10% KH₂PO₄, 10% KNO₃, mikroelementi, 7,5% Fe-EDTA). Dve nedelje kasnije tretirane su vodenim ekstraktom *S. montana*. Listovi i korenovi tretiranih biljaka, uzorkovani 24 h, 72 h i 120 h nakon tretmana, su korišćeni u daljem radu.

Priprema ekstrakata za određivanje biohemijjskih parametara

Ekstrakt svežeg biljnog materijala (listova i korenova tretiranog korova) dobijeni su homogenizacijom 1 g svežeg biljnog materijala u avanu uz dodatak 10 ml 0,1 mol/dm³ KH₂PO₄ pufera (pH 7). Nakon homogenizacije, homogenat je prenet u plastičnu epruvetu. Dobijeni ekstrakti su centrifugirani na 2500 x g 15 min. Supernatant je korišćen kao uzorak u daljim analizama.

Biohemijske analize

Aktivnost superoksid-dizmutaze (SOD, EC 1.15.1.1) određena je po metodi Mandal et al. (2008) sa malim izmenama, koja se zasniva na principu sposobnosti inhibicije fotohemijske redukcije nitroblutetrazolijum-hlorida (NBT). Reakcioni medijum činili su: 200 µl fosfatnog pufera (pH 7,8), 600 µl NBT-a ($63 \mu\text{mol/dm}^3$), 200 µl L-metionina (13mmol/dm^3), 200 µl EDTA ($0,1 \text{mmol/dm}^3$), 600 µl riboflavina ($13 \mu\text{mol/dm}^3$) i 20 µl ekstrakta svežeg biljnog materijala (odnosno vode u slepoj probi). Epruvete sa reakcionim smešama izložene su 15 min fluorescentnoj lampi od 18 W, a zatim su očitane apsorbance slepe i radnih proba na $\lambda = 560 \text{nm}$. Aktivnost SOD izražava se kao 1 jedinica (U), definisana kao količina SOD potrebna za 50 % inhibicije redukcije NBT, a u ovom radu je izražen kao broj U po mg proteina (U/mg proteina). Aktivnost katalaze (CAT, EC 1.11.1.6), je određena pomoću vodonik-peroksida kao supstrata (Sathya and Bjorn, 2010). Radna proba je pripremljena dodavanjem 0,02 ml homogenata u 1 ml 50mmol/dm^3 fosfatnog pufera (pH 7) i $10 \text{mmol/dm}^3 \text{H}_2\text{O}_2$. Merena je apsorbance na $\lambda = 240 \text{nm}$. Rezultati su izraženi u broju U ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}$) po mg proteina (U/mg proteina).

Statistička obrada podataka

Ogled je izveden u tri ponavljanja, a rezultati predstavljeni kao srednja vrednost. Određena je standardna greška (SE). Urađen je Duncan-ov test višestrukih intervala. Podaci su obrađeni primenom softverskog paketa Microsoft Excel for Windows version 2007 i Statistica for Windows version 12 (StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA).

Rezultati i diskusija

U Tabeli 2. su prikazani rezultati uticaja vodenog ekstrakta *S. montana* na aktivnost enzima antioksidativne zaštite superoksid-dismutaze i katalaze, u listu i korenu klasače. U listu klasače, pod uticajem vodenog ekstrakta *S. montana* koncentracije 0,1% zabeležen je porast aktivnosti enzima katalaze 24 h nakon tretmana, dok u tretmanu sa višom koncentracijom nije došlo do statistički značajnih promena u aktivnosti ovog enzima. Obe primenjene koncentracije prouzrokovale su porast aktivnosti superoksid-dismutaze nakon 72 h i 120 h. Najveći porast zabeležen je nakon 120 h u tretmanu sa 0,2% vodenim ekstraktom *S. montana*, kada je postignuta skoro četiri puta veća aktivnost ovog enzima u odnosu na kontrolnu grupu biljaka.

Tabela 2

Uticaj vodenog ekstrakta *S. montana* (0,1% i 0,2%) na aktivnost enzima antioksidativne zaštite CAT i SOD u listu i korenu klasače.

Table 2

The effect of two concentrations (0.1 and 0.2%) of the *S. montana* aqueous extracts on the activities of CAT and SOD (U/mg protein) in leaves and roots of the *Bromus mollis*

Vreme	24h	72h	120h	
List	Kontrola	$15.33 \pm 1.66^{a,b}$	$20.53 \pm 1.74^{a,c}$	8.94 ± 0.37^b
CAT	0.1 %	42.93 ± 7.21^d	25.60 ± 3.51^c	$16.66 \pm 1.56^{a,b,c}$
	0.2 %	12.51 ± 0.62^a	$25.44 \pm 1.66^{c,d}$	$13.64 \pm 1.85^{a,b}$
SOD	Kontrola	36.14 ± 2.35^a	11.87 ± 0.21^e	11.59 ± 0.19^e
	0.1 %	33.15 ± 0.53^a	18.35 ± 0.60^d	27.78 ± 0.60^c
	0.2 %	33.27 ± 0.93^a	33.10 ± 2.28^a	39.75 ± 0.19^b
Koren	Kontrola	4.13 ± 0.20^a	3.27 ± 0.86^a	5.03 ± 0.67^a
	0.1 %	$11.93 \pm 0.62^{b,c}$	19.94 ± 0.72^d	24.49 ± 0.34^e
	0.2 %	11.52 ± 0.55^b	14.07 ± 0.96^c	$13.45 \pm 0.8^{b,c}$
SOD	Kontrola	29.35 ± 6.04^a	10.24 ± 2.24^c	18.85 ± 1.94^c
	0.1 %	$39.40 \pm 1.10^{a,b}$	77.32 ± 10.34^d	89.18 ± 0.00^d
	0.2 %	$36.44 \pm 2.85^{a,b}$	$35.08 \pm 3.85^{a,b}$	46.87 ± 0.00^b

Srednja vrednost \pm koeficijent varijacije. ^{a-e} tretmani označeni različitim malim slovom statistički se značajno razlikuju ($P > 0.05$). Aktivnosti CAT i SOD su izražene u U/mg proteina.

Koren klasače se pokazao osetljivijim na uticaj vodenog ekstrakta *S. montana*. Aktivnosti superoksid-dismutaze i katalaze su se statistički značajno povećavale u prvih 72 h, naročito u tretmanu sa vodenim ekstraktom *S. montana* koncentracije od 0,1%. Izmerena aktivnost superoksid-dismutaze je bila skoro osam puta veća kod tretiranih u odnosu na kontrolnu grupu biljaka nakon 72 h.

Alelopatski efekti drugih biljaka familije Lamiaceae su ispitivani u većem broju studija. Safari et al. (2010) su ustanovili da vodeni ekstrakti biljke *Thymus kotschyanus* (Lamiaceae) ispoljavaju dozno-zavisne alelopatske efekte na klijanje semena i rast klijanaca *Bromus tomentellus*. Takođe, Bajalan et al. (2013) su ispitivali dejstvo različitih koncentracija vodenog ekstrakta žalfije (*Salvia officinalis* (Lamiaceae)) na klijanje semena štira (*Amaranthus retroflexus*) i ustanovili da primenjeni ekstrakti pokazuju snažan inhibitorski efekat na klijavost semena. Ispitivanjem alelopatskog uticaja vodenog ekstrakta *Lavandula officinalis* (Lamiaceae), ustanovljeno je da pored toga što postoji inhibicija klijanja semena *Amaranthus retroflexus*, postoji i inhibitorski efekat na dužinu korena i masu suvog biljnog materijala (Akbarzadeh i sar., 2013).

Primeri prirodnih bioherbicida su vodeni ekstrakti sirka (*Sorghum bicolor* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.) koji su se pokazali kao veoma efikasna zaštita gajenih biljaka bez gubitaka u prinosu (Soltys et al., 2013). Međutim, upotrebom ekstrakata može da se maskira efekat jedne alelopatske supstance drugom zbog čega su interesovanja naučnika usmerena ka izolaciji i aplikaciji pojedinačnih alelopatskih supstanci. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da vodeni ekstrakt *S. montana* poseduje alelopatski potencijal prema tretiranom korovu. Međutim, neophodna su dalja istraživanja da bi se utvrdilo da li poseduje herbicidno dejstvo.

Zaključci

Povećana aktivnost enzima superoksid-dismutaze i katalaze u listu i korenu korova klasače potvrđuje alelopatsko delovanje vodenog ekstrakta biljke *S. montana* na testirani korov. Navedeno dalje potvrđuje da biljne vrste i njihovi ekstrakti mogu biti dobri izvori prirodnih herbicida.

Literatura

- Akbarzadeh, M., Bajalan, I., Qalayi, E. 2013. Allelopathic effect of Lavender (*Lavandula officinalis*) on seed germination of velvet flower and purslane. *Int. J. Agron. Plant Product.* 4(6): 1285–1289.
- An, M., Liu, D.L., Johnson, I.R., Lovett, J.V. 2003. Mathematical modelling of allelopathy: II. The dynamics of allelochemicals from living plants in the environment. *Ecol. Model.* 161: 53–66.
- Bajalan, I., Oregani, K.E., Moezi, A.A., Gholami, A. 2013. Allelopathic Effects of Aqueous Extract from *Salvia officinalis* L. On Seed Germination of Wheat and Velvet flower. *Techn. J. Engin. App. Sci.* 3(6): 485–488.
- Bhadoria, P.B.S. 2011. Allelopathy: A Natural Way towards Weed Management. *Amer. J. Exp. Agric.* 1(1): 7–20.
- Bogatek, R., Gniazdowska, A. 2007. ROS and Phytohormones in Plant-Plant Allelopathic Interaction. *Plant Signal. Behav.* 2(4): 317–318.
- Chou, C.H. 2006. Introduction to allelopathy. In: Regiosa, M.J., Pedrol, N., González, L., (Eds.): *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp.1–9.
- De Albuquerque, M.B., Dos Santos, R.C., Lima, L.M., Melo Filho, P.A., Nogueira, R.J.M.C., Da Camara, C.A.G., Ramos, A.R. 2011. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 31: 379–395.
- Ding, J., Sun, Y., Xiao, C.L., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu, J.Q. 2007. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. *J. Exp. Bot.* 58(13): 3765–3773.
- Dmitrović, S. 2012. Alelopatski efekti transformisanih korenova. (Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu).
- Gatti, A.B., Ferreira, A.G., Arduin, M., Perez, S.C.G.A. 2010. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artisotolochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. *Acta Bot. Bras.* 24: 454–461.
- Gella, D., Ashagre, H., Negewo, T. 2013. Allelopathic effect of aqueous extracts of major weed species plant parts on germination and growth of wheat. *J. Agric. Crop Res.* 1(3): 30–35.
- Gniazdowska, A., Bogatek, R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiol. Plant.* 27: 395–407.
- Janjić, V., Stanković-Kalezić, R., Radivojević Lj. 2008. Prirodni proizvodi sa alelopatskim, herbicidnim i toksičnim delovanjem. *Acta Herbologica* 17: 1–22.
- Kato-Noguchi, H. 2004. Allelopathic substance in rice root exudates: Rediscovery of momilactone B as an allelochemical. *J. Plant Physiol.* 161: 271–276.
- Kato-Noguchi, H., Ino, T. 2003. Rice seedlings release momilactone B into the environment. *Phytochem.* 63: 551–554.
- Kato-Noguchi, H., Ino, T. 2005. Concentration and release level of momilactone B in the seedlings of eight rice cultivars. *J. Plant Physiol.* 162: 965–969.
- Kato-Noguchi, H., Ino, T. 2005. Possible involvement of momilactone B in rice allelopathy. *J. Plant Physiol.* 162: 718–721.

- Kovačević, D., Momirović, N. 2000. Uloga integralnih sistema u suzbijanju korova u konceptu održive poljoprivrede. Acta Herbologica, 9: 29–40.
- Li, Y., Hu, T., Zeng, F., Chen, H., Wu, X. 2013. Effects of *Eucalyptus grandis* Leaf Litter Decomposition on the Growth and Resistance Physiology Traits of *Eremochloa ophiuroides*. J. Plant Stud. 2(1): 158–165.
- Liu, Y., Li, F., Huang, Q. 2013. Allelopathic effects of gallic acid from *Aegiceras corniculatum* on *Cyclotella caspia*. J. Environ.Sci. 25(4): 776–784.
- Mandal, C., Ghosh, N., Adak, M.K., Dey, N. 2013. Interaction of polyamine on oxidative stress induced by exogenously applied hydrogen peroxide in *Salvinia natans* Linn. Theor. Exp. Plant Physiol. 25(3): 203–212.
- Mandal, S., Mitra, A., Mallick, N. 2008. Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 72: 56–61.
- Safari, H., Tavili, A., Saberi, M. 2010. Allelopathic effects of *Thymus kotschyanus* on seed germination and initial growth of *Bromus tomentellus* and *Trifolium repens*. Frontiers Agric. Chi. 4(4): 475–480.
- Sathya, E., Bjorn, M. 2010. Spectrophotometric Assays for Antioxidant Enzymes in Plants. In: Sathya, E., Bjorn M., (Eds.): Plant Stress Tolerance. Humana Press, Oklahoma, USA, pp. 273–280.
- Soltys, D., Krasuska, U., Bogatek, R., Gniazdowska, A. 2013. Allelochemicals as Bioherbicides-Present and Perspectives, Herbicides – Current Research and Case Studies in Use, doi: 10.5772/56185.
- Weir, T.L., Park, S.W., Vivanco, J.M. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. Curr. Opin. Plant Biol. 7: 472–479.
- Wójcicka, A. 2010. Cereal Phenolic Compounds as Biopesticides of Cereal Aphids. Pol. J. Environ. Stud. 19(6): 1337–1343.

Oxidative stress in bromus (*Bromus mollis* L.) seedlings treated with *Satureja montana* L. aqueous extract

Jovana Šućur*, Dejan Prvulović, Đorđe Malenčić

University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Field and Vegetable Crops, Novi sad, Serbia

*Corresponding author: jovana.sucur@polj.edu.rs

ABSTRACT

Extensive use of synthetic pesticides has negative effects on the environment and on human and animal health. Knowledge on allelopathic interactions could provide effective tools for a better exploitation of natural resources in the management of weeds without using herbicides. The effects of two concentrations (0.1% and 0.2%) of *Satureja montana* L. aqueous extract on the activity of the antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in leaves and roots of bromus (*Bromus mollis* L.) seedlings, were examined. The obtained results showed the significant increase of the superoxide dismutase activity in leaves and roots of bromus. The significant increase of the catalase activity was recorded in roots of bromus. The increase of the activities of antioxidant enzymes, in response to stress induced by *S. montana* aqueous extract, indicate that the plant extract possesses allelopathic activity on treated plant.

KEY WORDS

Allelopathy, *Bromus mollis* L., *Satureja montana* L.

Primljen: 21.09.2017.

Prihvaćen: 06.12.2017.