

Alelopatski potencijal biljnog ekstrakta zelenih plodova oraha (*Juglans regia* L.)

Nikolija Krstić¹, Jelena Gajić Umiljendić², Tijana Đorđević², Ljiljana Šantrić², Marija Sarić-Krsmanović²

¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080, Beograd-Zemun, Srbija

²Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Banatska 31b, 11080 Beograd-Zemun, Srbija
e-mail: marijasaric.msaric@gmail.com

REZIME

Cilj ovog rada je bio da se ispita alelopatski potencijal biljnog ekstrakta izolovanog iz zelenih plodova oraha na klijanje i rani porast semena dve korovske vrste (*Amaranthus retroflexus* i *Chenopodium album*), kao i fitotoksični efekat na klijanje i rani porast semena kukuruza *Zea mays*. Pored toga, cilj je bio i da se uradi analiza biljnog ekstrakta i procena njegove antioksidativne aktivnosti.

Antioksidativna aktivnost biljnog ekstrakta određivana je kroz sposobnost neutralizacije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala i ispitivanjem sposobnosti redukcije gvožđa FRAP metodom. Inhibicija merenih parametara (ukupna kljavost i dužina klijanaca) se proporcionalno smanjivala sa smanjenjem koncentracije rastvora biljnog ekstrakta izolovanog iz zelenih plodova oraha. Takođe, parametar dužina klijanaca je ispoljio veću osetljivost u odnosu na parametar ukupne kljavosti semena kod obe korovske vrste. Iako, dobijeni rezultati iz biotesta sa semenima pokazuju visok inhibitorni efekat na klijanje i rani porast obe korovske vrste, ujedno ukazuju i na fitotoksične efekte kod ranog porasta semena gajene vrste *Z. mays*. Buduća istraživanja će se fokusirati na HPLC analizu biljnog ekstrakta izolovanog iz zelenih plodova oraha i njegovog alelopatskog svojstva na rani porast biljaka testiranih vrsta.

Ključne reči: alelopatija, fenoli, *Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus*, kukuruz.

UVOD

Štetni uticaji herbicida tokom poslednjih decenija na životnu sredinu i zdravlje ljudi, povećanje broja korovskih vrsta koje su razvile rezistentnost na herbicide, sporiji razvoj novih herbicida, povlačenje iz upotrebe značajanog broja herbicida i sve veći razvoj organske poljoprivrede bili su glavni faktori za stimulisanje razvoja ekološki prihvatljivih pristupa u suzbijanju korova (Hatcher et al., 2003; Vila et al., 2010; Villa et al., 2017; Hossard et al., 2017; Kaniserry et al., 2019). Alelopatija kao jedan od njih odnosi se na svaki, direktan ili indirektan, blagotvoran ili štetan uticaj prouzrokovao od strane biljaka koje utiču na rast i razvoj drugih biljaka (Narwal, 2010). Biljke svoje produkte metabolizma mogu izlučivati preko eksudata korena, evaporacijom iz nadzemnih delova ili dekompozicijom biljnog materijala u zemljištu (Wu et al., 2000; An et al., 2003; Gatti et al., 2010), što za posledicu može imati inhibiciju ili retardaciju klijanja semena, inhibiciju rasta korenovog sistema, pucanje korenčića, nedostatak korenskih dlačica, izduživanje koleoptila i sl. (Bhadoria, 2011; Gella et al., 2013). Prirodni produkti su izvor brojnih jedinjenja koja se mogu koristiti kao vodeće strukture za sintezu novih bioherbicida za samostalno korišćenje ili u kombinaciji sa sintetičkim herbicidima u sklopu integrisane strategije suzbijanja (Duke et al., 2000). Bioherbicidi napravljeni od prirodno sintetisanih komponenti sa alelopatskim svojstvima su lako razgradivi, što njihovu primenu čini sigurnijom u odnosu na sintetičke herbicide (Belz, 2007).

Orah se ubraja u biljke sa najviše antioksidanasa, a pored toga sadrži velike količine lipida i ulja (i do 70%), proteine, ugljene hidrate, vitamine (C i E), esencijalne masne kiseline, fenolne kiseline (p-kumarinska, hlorogenska, vanilna, siriginska kiselina), flavonoide (kvercetin, katehin, mircetin) i hinone (juglandin i juglon), kao i saponine, taninine, alkalioide, glukozide i dr (Cosmulescu et al., 2014; Rusu et al., 2020; Zurek et al., 2022). Naime, orah predstavlja značajan izvor fitohemikalija koje mogu imati alelopatska svojstva. Stoga je cilj ovog rada bio da se ispita alelopatski potencijal biljnog ekstrakta izolovanog iz zelenih plodova oraha, i to da se: (1) uradi analiza biljnog ekstrakta i procena njegove antioksidativne aktivnosti; (2) potom, procena *in vitro* alelopatskog dejstva biljnog ekstrakta zelenih plodova oraha na klijanje i rani porast semena dve korovske vrste, i to *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, kao i fitotoksični efekat na klijanje i rani porast semena kukuruza *Zea mays*.

MATERIJAL I METODE

Ispitivanje alelopatskog potencijala biljnog ekstrakta zelenih plodova *J. regia* na klijanje semena i rani porast klijanaca *A. retroflexus* i *C. album*, kao i fitotoksičnosti na klijanje semena i rani porast klijanaca *Z. mays* rađeno je u ogledima u kontrolisanim uslovima.

Biljni materijal. U biotestovima sa semenima i biljkama korišćena su semena dve korovske vrste: *A. retroflexus* (prikupljena na lokalitetu Surčin) i *C. album* (prikupljena na lokalitetu Novi Beograd). Prikupljeno seme je prečišćeno i čuvano u papirirnoj kesi u laboratoriji na

sobnoj temperaturi od 20-22°C. U ogledu je korišćeno komercijalno seme kukuruza (hibrid NS3022) iz Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu.

Biotest sa semenima. Semena korovskih test vrsta *A. retroflexus* i *C. album*, kao i gajene vrste *Z. mays* su pre postavljanja ogleda potopljena u rastvor tiouree na 24h, potom su sterilisana sa 3% rastvorom vodonik peroksida u trajanju od 5 minuta nakon čega su tri puta dobro isprana destilovanom vodom. Po 25 dezinfikovanih i u filter papiru prosušenih semena dve korovske vrste je preneto u sterilisane Petri posude (prečnika 9 cm) i dodato po 5 ml pripremljenog biljnog ekstrakta zelenog ploda oraha koncentracije 1% i serije rablaženja od 0,75%, 0,50%, 0,25% i 0,10%, dok je po 25 semena kukuruza preneto u Petri posude (prečnika 14 cm) i dodato po 10 ml biljnog ekstrakta istih koncentracija. Petri posude su zatvorene parafilmom da bi se izbeglo isparavanje rastvora i odložene u inkubator (Velpro, Srbija) u uslovima mraka na temperaturi od 27°C. Destilovana voda je korišćena kao kontrolna varijanta. Svi tretmani su rađeni u četiri ponavljanja i ogled je ponovljen dva puta. Prebrojavanje broja proklijalih semena i merenje dužina klijanaca urađeno je nakon 7 dana ogleda.

Ekstrakcija biljnog materijala sukcesivnom ultrazvučnom ekstrakcijom. Zeleni plodovi oraha ekstrahovani su sukcesivnom ultrazvučnom ekstrakcijom uz korišćenje rastvarača sa različitim polarnošću kako bi se ostvario zadovoljavajući prinos fenolnih jedinjenja kao i ostalih sekundarnih metabolita biljaka različite polarnosti. Odnos samlevenog biljnog materijala i rastvarača bio je 1:1 (w/v). Ekstrakcija je sprovedena homogenizacijom u erlenmajerima na ultrazvučnom kupatilu (u trajanju od 15 minuta, na temperaturi od 30°C, pri frekvenciji 37 kHz i jačini ultrazvučnog kupatila od 168 W), i to u sedam ekstrakcionih ciklusa redom sa: heksanom, etil-acetatom, acetonom, acetonitrilom, etanolom, metanolom i destilovanom vodom. Alikvoti ekstrakata iz svakog ciklusa ekstrakcije filtrirani su preko kvantitativnog filter papira u balon za uparavanje i uparavani na rotacionom vakuum uparivaču na 40°C do suvog ostatka, a ostatak biljnog materijala vraćan je na ekstrakciju sledećim rastvaračem. Svi suvi ostaci prebačeni su u jedan sud rastvaranjem sa malo destilovane vode. Združeni ekstrakt zamrznut je na -80°C u posudi za liofilizaciju i osušen liofilizacijom. Suvi uzorak čuvan je u vijalama na -20°C do daljih analiza.

Hemijska analiza vodenog ekstrakta. 1. Određivanje ukupnih polifenola. Ukupni sadržaj polifenolnih jedinjenja određen je u pripremljenom biljnom ekstraktu po Folin-Ciocalteu metodi. Metoda je bazirana na oksidaciji prisutnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom (smešom fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline) pri čemu se sam reagens redukuje uz formiranje plavog kompleksa, a intenzitet dobijene plave boje srazmeran je količini fenola u rastvoru. Napravljen je rastvor biljnog ekstrakta zelenog ploda oraha u koncentraciji 10 mg mL⁻¹ u vodi. U epruvetu je sipano 0,1 mL rastvora uzorka, dodato je 0,5 mL rastvora Folin-Ciocalteu reagensa i 6 mL destilovane vode. Nakon energičnog mešanja na vorteksu dodato je 2 mL 15%-tnog rastvora Na₂CO₃ i dopunjeno sa destilovanom vodom do ukupne zapremine od 10 mL. Ovako pripremljena reakciona smeša ostavljena je na sobnoj temperaturi 60 minuta nakon čega je merena absorbanca na $\lambda = 760$ nm. Spektrofotometrijsko merenje radi se prema slepoj probi koja se priprema istovremeno pri čemu se umesto uzorka uzima 0,1 mL čistog rastvarača (destilovane vode).

Rezultati su izraženi u mg galne kiseline (GA) na g suvog ekstrakta i izračunati su uz korišćenje kalibracione krive. Za pripremu kalibracione krive napravljena je serija razblaženja standarda galne kiseline u vodi u rasponu od 0,1 do 1,5 mg mL⁻¹ i korišćena je umesto uzorka u opisanoj metodi. Iz nađenih ekstinkcionih vrednosti konstruisana je kriva.

2. Određivanje ukupnih flavonoida. Ukupni sadržaj flavonoida određivan je u pripremljenom biljnom ekstraktu aluminijum-hlorida kolorimetrijskom metodom. Metoda je bazirana na tome da flavoni i flavonoli sa aluminijum-hloridom formiraju stabilan kiseli kompleks koji intenzivno absorbuje na $\lambda = 510$ nm pri čemu se razvija roze boja, a intenzitet boje srazmeran je količini flavonoida u rastvoru.

Napravljen je rastvor biljnog ekstrakta zelenog ploda oraha u koncentraciji 5 mg mL⁻¹ u metanolu. U epruvetu je sipano 1,5 mL 5%-tnog rastvora NaNO₂, dodato 375 μ L rastvora uzorka i ostavljeno da reaguje 6 minuta. Nakon toga, dodato je 150 μ L 10%-tnog rastvora AlCl₃, promućkano na vorteksu, ostavljeno na sobnoj temperaturi 5 minuta te je dodato 750 μ L 1M NaOH. Reakciona smeša je ostavljena na inkubaciji 15 minuta nakon čega je (nakon pojave roze boje) merena absorbanca na $\lambda = 510$ nm. Spektrofotometrijsko merenje rađeno je prema slepoj probi koja je pripremana istovremeno pri čemu je umesto uzorka uzeto 375 μ L čistog rastvarača (metanola).

Rezultati su izraženi u mg kvercetina (QE) na g suvog ekstrakta i izračunati su uz korišćenje kalibracione krive. Za pripremu kalibracione krive napravljena je serija razblaženja standarda kvercetina u metanolu u rasponu od 0,05-0,5 mg mL⁻¹ i korišćena je umesto uzorka u opisanoj metodi. Iz nađenih ekstinkcionih vrednosti konstruisana je kriva.

Određivanje antioksidativne aktivnosti - ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala. Antioksidativna aktivnost biljnog ekstrakta određivana je kroz sposobnost neutralizacije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala, stabilnog azotnog radikala koji se prilikom reakcije sa donatorom protona redukuje do DPPH-H i dovodi do promene boje iz ljubičaste u žutu. Intenzitet promene boje se određuje spektrofotometrijski na $\lambda = 517$ nm. Napravljen je biljni ekstrakt zelenog ploda oraha u koncentraciji od 10 mg/mL u destilovanoj vodi. Od ovog stoka rastvora pripremljena je serija razblaženja u konačnom opsegu koncentracija ekstrakta zelenog ploda oraha od 0,01-0,2 mg mL⁻¹. Reakcione smeše pripremljene su tako što je u epruvetu sipano 0,5 mL rastvora uzorka, 3 mL metanola i 1 mL 0,2 mM rastvora DPPH u metanolu. Nakon snažnog mućkanja na vorteksu epruvete su dopunjene do zapremine od 5 mL sa metanolom. Reakcione smeše ostavljene su na inkubaciji 30 minuta na 25°C u mraku. Nakon isteka vremena merena je absorbanca na $\lambda = 517$ nm. Spektrofotometrijsko merenje rađeno je prema kontroli koja je pripremana istovremeno pri čemu je umesto uzorka uzeto 0,5 mL čistog rastvarača (destilovane vode). Rezultati su izraženi kao procenti inhibicije, odnosno neutralizacije slobodnog DPPH radikala u odnosu na kontrolu.

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{kontrola}}} \times 100 \quad [1]$$

Rastvor askorbinske kiseline korišćen je kao referentna supstanca. Konstruisane su krive zavisnosti koncentracije ekstrakta i procenta inhibicije DPPH radikala i izračunate su IC₅₀

vrednosti koje predstavljaju koncentraciju ekstrakta potrebnog za inhibiciju 50% početne količine DPPH radikala.

Određivanje antioksidativne aktivnosti - ispitivanje sposobnosti redukcije gvožđa FRAP metodom. Antioksidativna aktivnost biljnog ekstrakta određivana je i FRAP metodom koje se zasniva na sposobnosti antioksidanasa da redukuju gvožđe iz trovalentnog feri Fe^{3+} oblika do dvovalentnog fero Fe^{2+} oblika koji ima afinitet vezivanja za TPTZ u kiseloj sredini uz formiranje intenzivno plavo obojenog kompleksa gvožđe(II)-tripiridil-S-triazin[Fe(II)-(TPTZ)_2] $^{2+}$. Napravljen je rastvor biljnog ekstrakta zelenog ploda oraha u metanolu u koncentraciji 1 mg mL $^{-1}$. FRAP rastvor pripremljen je neposredno pre rada mešanjem acetatnog pufera (0,1 M sirćetna kiselina (185 mL) + 0,1 M natrijum acetat (trihidrat) (15 mL)), 10 mM TPTZ rastvora (u 40 mM HCl) i 20 mM rastvora $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ u odnosu 10:1:1 (v/v/v)). U epruvetu je sipano 150 μL uzorka i 150 μL destilovane vode, dodato je 3 mL FRAP rastvora i nakon snažnog mućkanja na vorteksu reakciona smeša je ostavljena na inkubaciji 30 minuta na 37°C u mraku. Nakon isteka vremena merena je absorbanca na $\lambda = 593$ nm. Spektrofotometrijsko merenje rađeno je prema slepoj probi – FRAP rastvoru. Rastvor butilovanog hidtoksitoluena (BHT) korišćen je kao referentna supstanca. Rezultati su izraženi u nmol Fe^{2+} jona po g suvog ekstrakta i izračunati su uz korišćenje kalibracione krive. Za pripremu kalibracione krive napravljena je serija razblaženja $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u rasponu od 500 do 5.000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i korišćena je umesto uzorka u opisanoj metodi. Iz nađenih ekstinkcionih vrednosti konstruisana je kriva.

Statistička obrada podataka. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti $\pm$ standardna devijacija. Dobijeni podaci su analizirani pomoću jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) koristeći STATISTICA 8.0. softverski paket. Kada su vrednosti F bile statistički značajne ($P < 0,05$) tretmani su poređeni pomoću LSD testa. Vrednosti za efektivne koncentracije (EC_{50}) biljnog ekstrakta različitih koncentracija su računane pomoću BIOASSAY 97 softverskog paketa.

REZULTATI I DISKUSIJA

Alelopatski uticaj biljnog ekstrakta zelenih plodova *J. regia* na klijanje

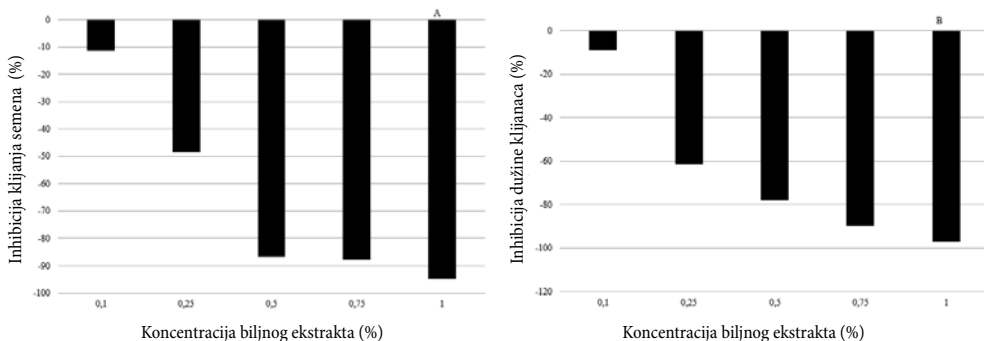
A. retroflexus i *C. album*

Klijavost (%) semena *A. retroflexus* se kretala u intervalu od 5-97%, pri čemu je najveća klijavost zabeležena u kontroli (97%) i tretmanu sa najnižom koncentracijom (0,10%) biljnog ekstrakta (86%). Nasuprot ovome, u tretmanima sa višim koncentracijama (1%, 0,75%, 0,50%) biljnog ekstrakta, inhibicija klijanja je bila 95%, 88% i 87%, redom (Tabela 1, Grafik 1a). Mereni parametar dužina klijanaca je ispoljio veću osetljivost u odnosu na klijanje semena, na šta ukazuju i inhibicije koje su se kretale od 44% za najnižu koncentraciju (0,10%), dok su za preostale koncentracije bile u rasponu od 61-97% (Grafik 1b). Statistički značajne razlike jedino nisu zabeležene između kontrole i najniže koncentracije kod oba parametra, dok je između koncentracija 0,25%, 0,50%, 0,75% i 1% i kontrole postojala statistička značajnost ($P < 0,05$), kao i između najniže koncentracije (0,10%) i viših koncentracija za oba parametra (Tabela 1).

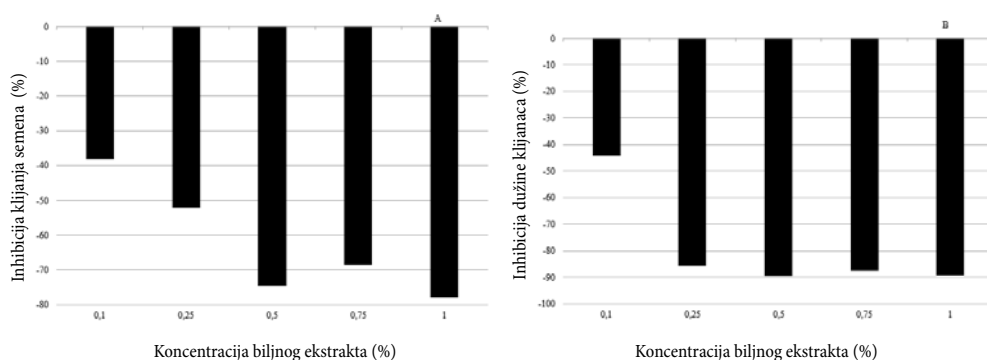
Tabela 1. Uticaj biljnog ekstrakta zelenih plodova *J. regia* na klijanje semena i rani porast klijanaca *A. retroflexus* i *C. album***Table 1.** The influence of plant extracts of immature *J. regia* fruit on the seed germination and early seedling growth of *A. retroflexus* and *C. album*

Tretmani	Amaranthus retroflexus		Chenopodium album	
	Ukupna klijavost (%)	Dužina klijanaca (cm)	Ukupna klijavost (%)	Dužina klijanaca (cm)
Kontrola	97,00 ± 3,82 a	5,04 ± 0,78 a	78,80 ± 3,00 a	4,11 ± 0,84 a
0,10%	86,00 ± 2,51 a	4,59 ± 0,67 a	48,80 ± 2,78 b	2,30 ± 0,57 b
0,25%	50,00 ± 1,75 b	1,95 ± 0,19 b	37,50 ± 1,96 bc	0,60 ± 0,18 c
0,50%	13,00 ± 0,89 c	1,11 ± 0,15 c	20,00 ± 1,01 c	0,44 ± 0,11 c
0,75%	12,00 ± 0,91 c	0,54 ± 0,08 cd	25,00 ± 1,11 c	0,53 ± 0,14 c
1%	5,00 ± 0,24 c	0,15 ± 0,03 d	17,50 ± 0,97 c	0,44 ± 0,09 c

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Razlike između različitih koncentracija biljnog ekstrakta za svaki parametar i korovsku vrstu su testirane jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), i to poređenjem sa Fisher-ovim testom najmanjih značajnih razlika (LSD), $P < 0,05$.

**Grafik 1.** Inhibicija klijanja semena (A) i dužine klijanaca (B) *A. retroflexus* pod uticajem različitih koncentracija biljnog ekstrakta zelenih plodova *J. regia***Figure 1.** Inhibition of seed germination (A) and seedling length (B) of *A. retroflexus* under different plant extract concentrations of immature *J. regia* fruits

Na osnovu dobijenih rezultata u biotestu sa semenima test vrsta *C. album* se izdvojila kao osetljivija. Naime, inhibicija klijanja i pri najnižoj koncentraciji (0,10%) je bila 38%, dok se pri višim koncentracijama kretala od 52-78% (Grafik 2a). U skladu sa rezultatima za prethodnu test vrstu i kod *C. album* se parametar dužina klijanaca izdvojio kao osetljiviji, pa je inhibicija pri najnižoj koncentraciji bila 44%, dok se pri ostalim koncentracijama kretala od 85-89% (Grafik 2b). Na veću osetljivost ove korovske vrste ukazuju i statistički značajne razlike ($P < 0,05$) koje su zabeležene između kontrole i svih ispitivanih koncentracija, kao i između najniže koncentracije (0,10%) i viših koncentracija za oba parametra (Tabela 1).



Grafik 2. Inhibicija klijanja semena (A) i dužine klijanaca (B) *C. album* pod uticajem različitih koncentracija biljnog ekstrakta zelenih plodova *J. regia*

Figure 2. Inhibition of seed germination (A) and seedling length (B) of *C. album* under different plant extract concentrations of immature *J. regia* fruits

Na veću osetljivost parametra dužina klijanaca u odnosu na ukupnu klijavost ukazuju i manje vrednosti EC_{50} koje su dobijene za taj parametar kod svih testiranih biljnih vrsta (Tabela 2).

Tabela 2. EC_{50} vrednosti za parametre klijanja i dužine klijanaca kod testiranih biljaka

Table 2. EC_{50} values for germination and seedling length parameters in the tested plants

Test biljka	$EC_{50} \pm SE$	
	Ukupna klijavost (%)	Dužina klijanaca (cm)
<i>Amaranthus retroflexus</i>	0,24 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,06
<i>Chenopodium album</i>	0,27 $\pm$ 0,09	0,14 $\pm$ 0,03
<i>Zea mays</i>	-	0,70 $\pm$ 0,13

Većina literaturnih podataka ukazuje da je dejstvo juglona na biljke uglavnom toksično, i da inhibira klijanje i početni rast mladih biljaka mnogih vrsta (Kocacalıskan and Terzi, 2001; Terzi, 2008; Qin et al., 2011; Maksimović i Hasanagić, 2020). Maksimović i Hasanagić (2020) su potvrdili alelopatski efekat juglona na klijanje semena paradajza i salate. Klijavost i rani porast semena paradajza najviše je inhibirao koncentrovani juglon, dok je kod nižih koncentracija zabeležen slabiji stimulativan efekat. Sa druge strane, u odnosu na paradajz, sve primenjene koncentracije juglona su imale značajan inhibitorski efekat na klijanje i rani porast semena zelene salate. Pored ovog i u drugim istraživanjima (Kocacalıskan and Terzi, 2001; Terzi, 2008; Qin et al., 2011) je potvrđeno inhibitorsko delovanje juglona na klijanje semena pojedinih biljnih vrsta, kao što su: kupus, cvekla, zelena salata, krastavac, lucerka i dr. Ujedno je pokazano da se inhibicija klijanja semena proporcionalno smanjivala sa smanjenjem koncentracije rastvora, što ukazuje na to da alelopatski efekat određenog ekstrakta značajno zavisi i od njegove koncentracije.

Fitotoksičan uticaj biljnog ekstrakta zelenih plodova *J. regia* na seme *Z. mays*

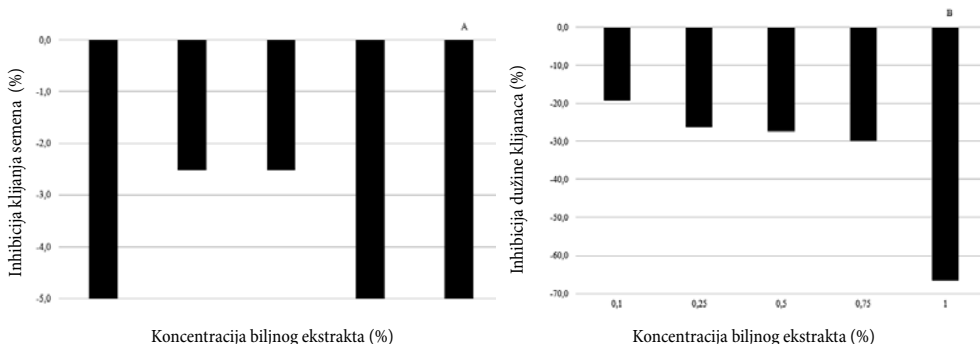
Dobijeni rezultati u biotestu sa semenima gde je praćen fitotoksični efekat na klijanje semena i rani porast klijanaca gajene vrste (*Z. mays*) prikazani su u Tabeli 3. U skladu sa rezultatima koji su dobijeni u biotestu sa semenima korovskih vrsta, gde je zabeležen manji inhibicioni uticaj na klijanje semena u odnosu na parametar ranog porasta klijanaca (dužina klijanaca) i kod *Z. mays* je primećen sličan uticaj. Fitotoksičan efekat na klijanje semena kukuruza je bio značajno manji gde se inhibicija od niže ka višoj koncentraciji ekstrakta kretala od 2,5-5% (Grafik 3a). Sa druge strane inhibicija dužine klijanaca *Z. mays* je bila 19,1-66,4% (Grafik 3b).

Tabela 3. Uticaj biljnog ekstrakta zelenih plodova *J. regia* na klijanje semena i rani porast klijanaca *Z. mays*

Table 3. The impacts of plants extracts of immature *J. regia* fruits on seed germination and early seedling growth of *Z. mays*

Tretmani	<i>Zea mays</i>	
	Ukupna klijavost (%)	Dužina klijanaca (cm)
Kontrola	100,00 ± 0,00 a	6,55 ± 0,86 a
0,10%	95,00 ± 2,88 a	5,30 ± 0,77 a
0,25%	97,50 ± 1,99 a	4,84 ± 0,72 a
0,50%	97,50 ± 1,87 a	4,77 ± 0,38 a
0,75%	95,00 ± 1,31 a	4,60 ± 0,56 a
1%	95,00 ± 1,24 a	2,20 ± 0,32 b

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Razlike između različitih koncentracija biljnog ekstrakta za svaki parametar su testirane jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), i to poređenjem sa Fisher-ovim testom najmanjih značajnih razlika (LSD), $P < 0,05$.



Grafik 3. Inhibicija klijanja semena (A) i dužine klijanaca (B) *Z. mays* pod uticajem različitih koncentracija biljnog ekstrakta zelenih plodova *J. regia*

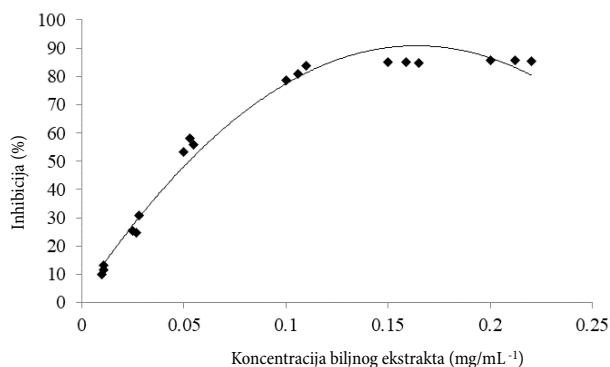
Figure 3. Inhibition of seed germination (A) and seedling length (B) of *Z. mays* under different plant extract concentrations of immature *J. regia* fruits

Statistička analiza podataka je potvrdila da kod ukupne klijavosti nema zabeleženih statistički značajnih razlika ($P = 0,485$), dok se kod dužine klijanaca statistička značajnost ($P < 0,05$) beleži između kontrole i najviše koncentracije (1%), kao i između najviše koncentracije i koncentracija (0,75%, 0,50%, 0,25%, 0,10%) (Tabela 2).

Hemijska analiza biljnog ekstrakta

Rezultati hemijske analize biljnog ekstrakta zelenih plodova oraha su pokazali da je ukupan sadržaj fenola (TPC) bio $173,7 \pm 7,9$ mg GAE g^{-1} suvog ekstrakta, dok je ukupan sadržaj flavonoida (TF) bio $870,9 \pm 16,3$ mg QE g^{-1} suvog ekstrakta. Rezultati antioksidativne aktivnosti izraženi u procentima inhibicije, tj. neutralizacije slobodnog DPPH radikala u odnosu na kontrolu su prikazani na Grafiku 4. kroz krivu zavisnosti koncentracije biljnog ekstrakta i procenta inhibicije DPPH radikala. IC_{50} vrednost, odnosno koncentracija ekstrakta zelenih plodova oraha koja je potrebna za inhibiciju 50% početne količine DPPH radikala, iznosi $0,047$ mg mL^{-1} . Poređenjem ove vrednosti sa vrednosti IC_{50} za askorbinsku kiselinu koja se primenjuje kao komercijalni antioksidans, a koja iznosi $0,016$ mg mL^{-1} , može se uočiti da dobijeni ekstrakt zelenih plodova oraha pokazuje značajnu antioksidativnu aktivnost. Takođe, potvrda ovome je i vrednost dobijena analizom antioksidativne aktivnosti - ispitivanje sposobnosti redukcije gvožđa (FRAP) koja je iznosila $631,0$ μ mol Fe^{2+} g^{-1} suvog ekstrakta.

Mnogobrojna istraživanja su pokazala da se sadržaj ukupnih fenola i flavonoida menja sa starenjem biljke i njenih delova, kao i antioksidativni potencijal (Jahanban-Esfahlan et al., 2019; Rusu et al., 2019, 2020). Pored ovoga, jasne razlike su uočene u dobijenim vrednostima pri korišćenju svežeg ili suvog materijala, kao i različitih rastvarača što za rezultat daje različite vrednosti za ove parametre u različitim istraživanjima (Zarghami Moghaddam et al., 2017).



Grafik 4. Kriva zavisnosti koncentracije biljnog ekstrakta (mg mL^{-1}) i inhibicije DPPH radikala (%)

Figure 4. Response curve of the inhibition of DPPH radicals (%) in relation to the concentration of the plant extract (mg mL^{-1})

ZAKLJUČAK

Pozitivni rezultati prvog skrining sastava (ukupan sadržaj fenola i flavonoida) i antioksidativnih svojstava dobijenog biljnog ekstrakta iz zelenih plodova oraha navode na sledeći korak u istraživanju koji bi obuhvatio kompletnu HPLC analizu ovog biljnog ekstrakta. Rezultati biotesta sa semenima ukazuju na inhibitorni uticaj biljnog ekstrakta iz zelenih plodova oraha pri različitim koncentracijama na klijavost semena korovskih vrsta *A. retroflexus* i *C. album*. Inhibitorno dejstvo biljnog ekstrakta pri različitim koncentracijama zabeleženo je i na rani porast klijanaca. Iako, dobijeni rezultati iz biotesta sa semenima pokazuju visok inhibitorni efekat na klijanje i rani porast obe korovske vrste, ujedno ukazuju i na fitotoksične efekte kod ranog porasta semena gajene vrste *Z. mays*. Buduća istraživanja moraju obuhvatiti oglede na biljkama u saksijama, kao i poljske mikrooglede da bi se utvrdili bioherbicidni uticaji na korovske, odnosno fitotoksični efekti na gajene vrste.

ZAHVALNICA

Istraživanja u ovom radu realizovana su na osnovu ugovora o realizaciji i finansiranju naučno-istraživačkog rada NIO, evidencioni brojevi: 451-03-68/2022-14/200214 i 451-03-68/2022-14/200116.

LITERATURA

- An, M., Liu, D. L., Johnson, I. R., Lovett, J. V.: Mathematical modelling of allelopathy: II. The dynamics of allelochemicals from living plants in the environment. *Ecological Modelling*, 161, 53–66, 2003.
- Belz, R. G.: Allelopathy in crop/weed interactions – An update. *Pest Management Science*, 63, 308–326, 2007.
- Bhadoria, P. B. S.: Allelopathy: A Natural Way towards Weed Management. *American Journal of Experimental Agriculture*, 1, 7–20, 2011.
- Cosmulescu, S., Trandafir, I., Nour, V., Ionica, M., Tutulescu, F.: Phenolics content, antioxidant activity and color of green walnut extracts for preparing walnut liquor, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42, 551–55, 2014.
- Duke, S. O., Romagni, J. G., Dayan, F. E.: Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, 19, 583–589, 2000.
- Gatti, A. B., Ferreira, A. G., Arduin, M., Perez, S. C. G. A.: Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artisotelochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. *Acta Botanica Brasilica*, 24, 454–461, 2010.
- Gella, D., Ashagre, H., Negewo, T.: Allelopathic effect of aqueous extracts of major weed species plant parts on germination and growth of wheat. *Journal of Agricultural and Crop Research*, 1, 30–35, 2013.
- Hatcher, P. E., Melander, B.: Combining physical, cultural, and biological methods: Prospects for integrated non-chemical weed management strategies. *Weed Research*, 43, 303–322, 2003.
- Hossard, L., Guichard, L., Pelosi, C., Makowski, D.: Lack of evidence for a decrease in synthetic pesticide use on the main arable crops in France. *Science of the Total Environment*, 575, 152–161, 2017.

- Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Tabibiazar, R., Amarowicz, R.: A Comparative Review on the Extraction, Antioxidant Content and Antioxidant Potential of Different Parts of Walnut (*Juglans regia* L.) Fruit and Tree. *Molecules*, 24, 2133, 2019.
- Kaniserry, R., Gairhe, B., Kadyampakeni, D., Batuman, O., Alferez, F.: Glyphosate: Its Environmental Persistence and Impact on Crop Health and Nutrition. *Plants*, 8, 499, 2019.
- Kocacaliskan, B., Terzi, I.: Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. *Journal of Horticultura Science & Biotechnology*, 76 (4), 436-440, 2001.
- Maksimović, T., Hasanagić, D.: Allelopathic influence of *Juglans regia* L. aqueous extract on the germination and growth of lettuce and tomato. *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*, 74 (2), 5-12, 2020.
- Narwal, S. S.: Allelopathy in ecological sustainable organic agriculture. *Allelopathy Journal*, 25, 51-72, 2010.
- Qin, C., Nagai, M., Hagins, W., Hobbs, R.: The allelopathic effects of juglone containing nuts. *The Journal of Experimental Secondary Science*, 1-5, 2011.
- Rusu, M. E., Fizesan, I., Popa, A., Mocan, A., Gheldiu, A., Babota, M., Vodnar, D. C., Jurj, A., Berindan-Neagoe, I., Vlase, L., Popa, D. S.: Walnut (*Juglans regia* L.) Septum: Assessment of Bioactive Molecules and In Vitro Biological Effects. *Molecules*, 25, 2187, 2020.
- Rusu, M. E., Mocan, A., Ferreira, I. C. F. R., Popa, D. S.: Health Benefits of Nut Consumption in Middle-Aged and Elderly Population. *Antioxidants (Basel)*, 8, 302, 2019.
- Terzi, I.: Allelopathic effects of juglone and decomposed walnut leaf juice on muskmelon and cucumber seed germination and seedling growth. *African Journal of Biotechnology*, 7 (12), 1870-1874, 2008.
- Vilà, M., Basnou, C., Pyšek, P., Josefsson, M., Genovesi, P., Gollasch, S., Hulme, P. E.: How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8 (3), 135-144, 2010.
- Villa, F., Cappitelli, F., Cortesi, P., Kunova, A.: Fungal biofilms: Targets for the development of novel strategies in plant disease management. *Frontiers in Microbiology*, 8, 654, 2017.
- Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D., An, M.: Allelochemicals in Wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation of Phenolic Acids in Root Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5321-5325, 2000.
- Zarghami Moghaddam, P., Mohammadi, A., Feyzi, P., Alesheikh, P.: In vitro antioxidant and antibacterial activity of various extracts from exocarps and endocarps of walnut. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 1725-1731, 2017.
- Zurek, N., Pawłowska, A., Pycia, K., Grabek-Lejko, D., Kapusta, T. I.: Phenolic Profile and Antioxidant, Antibacterial, and Antiproliferative Activity of *Juglans regia* L. Male Flowers. *Molecules*, 27, 2762, 2022.

Allelopathic potential of plant extracts of immature walnut (*Juglans regia* L.) fruits

SUMMARY

The aim of this study was to test the allelopathic effects of the plant extracts isolated from immature walnut fruits on the germination and early seedling growth of two weed species (*Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium album*), and its phytotoxic effects on the germination and early seed growth of maize, *Zea mays*. Additionally, the goals was to also conduct an analysis of the plant extracts and determine its antioxidant properties.

Antioxidant activity of the plant extracts were determined via its ability to neutralize DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals and by testing their potential for iron reduction using the FRAP method. The inhibition of the measured parameters (total germination and seedling length) decreased proportionally, with the reduction of concentrations of plant extracts isolated

from immature walnut fruits. Also, the seedling length parameter has shown greater sensitivity when compared with the parameters of total seed germination in both weed species. Even though the results of both biotests with seeds show a high inhibitory effect on the germination and early growth of the tested weed species, they also point to phytotoxicity in early growth of *Z. mays* seeds. Future research will be focused on the HPLC analysis of the plant extracts isolated from immature walnut fruits and their allelopathic effects on the early growth of plants of the tested species.

Keywords: allelopathy, phenols, *Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus*, maize.