

Alelopatski potencijal biljnog ekstrakta iz stabla *Cuscuta campestris* Yunck.

Teodora Tojić¹ , Jelena Gajić Umiljendić² , Tijana Đorđević² ,
Marija Sarić-Krsmanović² 

¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet Zemun-Beograd, Srbija

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

REZIME

Alelopatski proseci obuhvataju interakcije između živih organizama koje se ostvaraju posredstvom sekundarnih metabolita (alelohemikalija). Vrste roda *Cuscuta* su poznate da proizvode hemijska jedinjenja koja se odlikuju različitim biološkim aktivnostima. Stoga, ova istraživanja su obuhvatila ispitivanje alelopatskog potencijala biljnog ekstrakta dobijenog iz stabla *Cuscuta campestris* na ukupnu klijavost i dužinu klijanaca semena korovskih vrsta *Amaranthus retroflexus* i *Portulaca oleracea*, kao i hemijske analize biljnog ekstrakta.

Hemijska analiza biljnog ekstrakta stabla *C. campestris* je pokazala da je dobijeni biljni ekstrakt bogat izvor fenolnih jedinjenja. HPLC analizom po svom sadržaju su se izdvojila sledeća jedinjenja: kvercetin (5,62 mg g⁻¹), katehin (3,71 mg g⁻¹) i diadzin (2,85 mg g⁻¹), luteolin (1,82 mg g⁻¹) i rutin (1,16 mg g⁻¹). Osim toga, veće koncentracije (0,75% i 1%) biljnog ekstrakta ove parazitarne cvetnice imale su inhibitorni efekat na ukupnu klijavost i dužinu klijanaca semena *A. retroflexus* i *P. oleracea*. *A. retroflexus* se pokazala kao osetljivija test biljka u odnosu na *P. oleraceae*, što potvrđuju procenti inhibicije klijanja semena od 88% (*A. retroflexus*) i 8% (*P. oleraceae*), odnosno inhibicija porasta klijanaca koja je bila 77% (*A. retroflexus*), odnosno 70% (*P. oleraceae*). Dobijeni rezultati su pokazali da alelopatska svojstva biljnog ekstrakta stabla *C. campestris* treba dalje testirati na veći broj korovskih vrsta u biotestovima sa biljkama i poljskim ogledima, jer je značajan izvor alelopatskih jedinjenja.

Ključne reči: alelopatija, biljni ekstrakt, fenoli, *Cuscuta campestris*.

UVOD

Integralni pristup suzbijanja korova se zasniva na primeni svih raspoloživih mera (agrotehničkih, fizičkih, mehaničkih, bioloških, hemijskih) i predstavlja održivu strategiju u borbi protiv korova. Iako je upotreba herbicida nezaobilazna mera u zaštiti useva od korova, postoje tendencije ka smanjenju njihove upotrebe što je poslednjih nekoliko decenija intenziviralo istraživanja u oblasti alelopatije, tj. procesa izazvanih od strane sekundarnih metabolita (alelohemikalija) koje proizvode biljke i drugi živi organizmi. Pojam "alelopatija" je prvobitno objašnjen kao direktno ili indirektno, štetno ili blagotvorno dejstvo jedne biljke (uključujući i mikroorganizme) na druge kroz sintezu i otpuštanje hemijskih jedinjenja u okolinu (Rice, 1984), da bi kasnije definicija bila dopunjena od strane Međunarodnog Alelopatiskog društva (The International Allelopathy Society - IAS) koje je osnovano pre više od 20 godina radi istraživanja u oblasti alelopatije, alelopatiskih interakcija između biljaka, mikroba i druge makrofaune u kopnenim i vodenim ekosistemima (<https://allelopathy-society.osupytheas.fr>).

Prepoznato je da alelohemikalije u agroekološkim uslovima mogu biti značajan alternativni izvor za suzbijanje korovskih vrsta (Romeo and Weidenhamer, 1999). Alelohemikalije mogu biti sintetisane u bilo kom organu biljaka (list, stablo, koren, cvet, plod, seme) i oslobođene u okruženje kroz procese isparavanja, ispiranja, izlučivanja korenom ili odumiranjem i propadanjem otpalih delova biljaka (Albuquerque et al., 2011). Alelohemikalije predstavljaju jedinjenja, produkte sekundarnog metabolizma, koji pripadaju brojnim hemijskim grupama, što čini njihovu klasifikaciju kompleksnom. Najviše istražene grupe sekundarnih metabolita su fenolna jedinjenja i terpeni, koje su se izdvojile i po svojoj alelopatiskoj aktivnosti. Glavna funkcija fenola unutar biljnih ćelija uključuje privlačenje oprašivača i odbijanje biljojeda (Li et al., 2010). Posle jednostavnih fenola, flavonoidi predstavljaju drugu, najveću grupu fenolnih jedinjenja čija je uloga do sada istraživana u okviru alelopatije (Macias et al., 2019).

Rod *Cuscuta* obuhvata veliki broj vrsta koje su do sada izučavane iz različitih uglova, kao korovi, vrste od interesa u farmakologiji i medicini, kao model biljke za izučavanje biljka – biljka interakcija i dr. (Flores-Sanches and Garza-Ortiz, 2019). Vrste roda *Cuscuta* odlikuje velika raznovrsnost sekundarnih metabolita koji ispoljavaju različite biološke aktivnosti. Otkrivena je mogućnost primene *C. campestris* za lečenje zapaljenskih procesa, kao analgetik i antidepresiv (Agha et al., 1996). Takođe, Khanh (2008) je istakao da alelohemikalije parazitskih cvetnica, uključujući i vrste roda *Cuscuta*, mogu biti korišćene za razvoj biopesticide u budućnosti.

Najznačajniji zadatak istraživanja alelopatiskog potencijala biljnih vrsta jeste mogućnost implementacije ovog procesa u integralnu zaštitu bilja, sa ciljevima koji se odnose na: smanjenje primene sintetičkih herbicida; očuvanja životne sredine; i obezbeđivanja održive poljoprivredne proizvodnje. Stoga, ova istraživanja su obuhvatila ispitivanje alelopatiskog potencijala biljnog ekstrakta dobijenog iz stabla *C. campestris* na ukupnu klijavost i dužinu klijanaca korovskih vrsta *Amaranthus retroflexus* i *Portulaca oleracea*, kao i hemijske analize dobijenog biljnog ekstrakta.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal. Stablo *C. campestris* je sakupljeno na lokalitetu Golubinci u julu 2020. godine., sa domaćina *Polygonum aviculare* i *Ambrosia artemisiifolia*. Sveže prikupljena stabla *C. campestris* su raspoređena u tankom sloju na kartonu i ostavljena da se suše na sobnoj temperaturi (20-22°C) u uslovima mraka u trajanju od 20 dana. Nakon toga, biljni materijal je sakupljen u papirne kese i odložen na suvo do pravljenja biljnog ekstrakta. U biotestovima su korišćena sledeća semena: *A. retroflexus* (prikupljena na lokalitetu Kačarevo, oktobar 2020. godine), *P. oleracea* (prikupljena na lokalitetu Noćaj, oktobar 2020. godine).

Ispitivanje alelopatškog potencijala biljnog ekstrakta iz stabla *C. campestris* na ukupnu klijavost semena i dužinu klijanaca *A. retroflexus* i *P. oleracea* rađeno je u ogledima u kontrolisanim uslovima po metodama koje su primenjene u ranijim istraživanjima (Krstić i sar., 2022).

Ekstrakcija biljnog materijala sukcesivnom ultrazvučnom ekstrakcijom. Suvi biljni materijal (stablo *C. campestris*) je ekstrahovan sukcesivnom ultrazvučnom ekstrakcijom uz korišćenje rastvarača sa različitim polarnošću kako bi se ostvario zadovoljavajući prinos fenolnih jedinjenja kao i ostalih sekundarnih metabolita biljaka različite polarности. Odnos samlevenog biljnog materijala i rastvarača bio je 1:4 (w/v). Ekstrakcija je sprovedena homogenizacijom u erlenmajerima na ultrazvučnom kupatilu (u trajanju od 40 minuta, na temperaturi od 30°C, pri frekvenciji 40 kHz i jačini ultrazvučnog kupatila od 240 W), i to u pet ekstrakcionih ciklusa redom sa: heksanom, hloroformom, etil-acetatom, 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 biljnog ekstrakta

Određivanje ukupnih polifenola. Ukupni sadržaj polifenolnih jedinjenja određen je u pripremljenom biljnom ekstraktu po Folin-Ciocalteu metodi. Napravljen je rastvor biljnog ekstrakta stabla *C. campestris* 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. Reakciona smeša ostavljena je na sobnoj temperaturi 60 minuta nakon čega je merena absorbanca na $\lambda = 760$ nm prema slepoj probi pripremljenoj istovremeno pri čemu je umesto uzorka uzeto 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 (standard galne kiseline u vodi napravljen u rasponu od 0,1 do 1,5 mg mL⁻¹).

Određivanje ukupnih flavonoida. Ukupni sadržaj flavonoida određivan je u pripremljenom biljnom ekstraktu aluminijum-hlorid kolorimetrijskom metodom. Napravljen je rastvor

biljnog ekstrakta stabla *C. campestris* u koncentraciji 5 mg mL⁻¹ u metanolu. U epruvetu je sipano 1,5 mL 5%-tnog rastvora NaNO₂, dodato 375 µL rastvora uzorka i ostavljeno da reaguje 6 minuta. Nakon toga, dodato je 150 µL 10%-tnog rastvora AlCl₃, promućkano na vorteksu, ostavljeno na sobnoj temperaturi 5 minuta te je dodato 750 µL 1M NaOH. Reakciona smeša je ostavljena na inkubaciji 15 minuta nakon čega je merena absorbanca na λ = 510 nm prema slepoj probi pripremljenoj istovremeno pri čemu je umesto uzorka uzeto 375 µL čistog rastvarača (metanola). Rezultati su izraženi u mg kvercetina (QE) na g suvog ekstrakta i izračunati su uz korišćenje kalibracione krive (standard kvercetina u metanolu napravljen u rasponu od 0,05 do 0,5 mg mL⁻¹).

Određivanje antioksidativne aktivnosti - ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala. Antioksidativna aktivnost biljnog ekstrakta određivana je kroz sposobnost neutralizacije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. Napravljen je biljni ekstrakt stabla *C. campestris* u koncentraciji od 10 mg/mL u destilovanoj vodi. Od ovog stoka rastvora pripremljena je serija razblaženja u konačnom opsegu koncentracija biljnog ekstrakta *C. campestris* od 0,05 do 0,5 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 λ = 517 nm 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.

$$\% \text{ inhibicije} = (A \text{ kontrola} - A \text{ uzorak}) \times 100 / A \text{ kontrola} \quad [1]$$

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. Napravljen je rastvor biljnog ekstrakta stabla *C. campestris* u metanolu u koncentraciji 5 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 i 20 mM rastvora FeCl₃ x 6H₂O 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 λ = 593 nm slepoj probi - FRAP rastvoru. Rezultati su izraženi u nmol Fe²⁺ jona po g suvog ekstrakta i izračunati su uz korišćenje kalibracione krive (FeSO₄ x 7H₂O napravljen u rasponu od 500 do 5.000 µmol L⁻¹).

HPLC analiza biljnog ekstrakta. Sadržaj fenolnih jedinjenja u biljnom ekstraktu određen je tehnikom tačne hromatografije visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu HPLC Shimadzu Prominence sa DAD detektorom. Korišćena je kolona Agilent, Zorbax Eclipse C18 (3,6 μm , 4,6mm x 150 mm). Detekcija pikova je izvršena na 260, 270, 280, 320 i 360 nm. Kao mobilna faza korišćen je sistem rastavača: A – 1%-tni rastvor sirćetne kiseline (CH_3COOH) u destilovanoj vodi (dH_2O), B – metanol (CH_3OH) i C – acetonitril (CH_3CN). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom linearnog gradijenta: 0 min - 90% A, 10% B, 0% C; 10 min - 80% A, 16% B, 4% C; 25 min - 75% A, 20% B, 5% C; 30 min - 65% A, 30% B, 5% C; 31 min - 40% A, 60% B, 0% C; 37 min - 35% A, 45% B, 20% C; 50 min - 20% A, 0% B, 80% C; 55-57 min - 0% A, 0% B, 100% C; 58-65 min - 90% A, 10% B, 0% C. Protok mobilne faze iznosio je 0,8 ml min⁻¹. Injektovano je 20 μL rastvora uzorka. Fenolne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektra sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. Korišćeni su standardi: 4-hidroksibenzojeve kiseline, kafene kiseline, katehina, cinamične kiseline, diadzina, epikatehina, epigalokatehina, epigalokatehin galata, ferulne kiseline, galne kiseline, genistina, glicitina, luteolina, miricetina, p-kumarne kiseline, protokatehične kiseline, kvercetin, rutina i vanilne kiseline. Kvantifikacija komponenti je izvršena metodom eksternog standarda, a masene koncentracije komponenti u uzorcima izražene su u mg/g suvog ekstrakta.

Biotest sa semenima. Semena korovskih test vrsta *A. retroflexus* i *P. oleracea* su pre postavljanja ogleada potopljena u rastvor tiouree na 24h, potom su sterilisana sa 5% rastvorom natrijum-hipohlorita i destilovane vode u trajanju od 3 minuta nakon čega su dobro isprana destilovanom vodom. Po 25 dezinfikovanih i u filter papiru prosušeni semena dve korovske vrste je preneto u sterilisane Petri posude (prečnika 9 cm) i dodato po 5 ml pripremljenog biljnog ekstrakta izolovanog iz stabla *C. campestris* koncentracije 1% i serije rablaženja od 0,75%, 0,5% i 0,25%. Petri posude su zatvorene parafilmom da bi se izbeglo isparavanje rastvora i odložene u inkubator (Velpro, Srbija) u uslovima mraka na temperaturi od 28°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 sedmog dana od postavljanja ogleada. Nakon testa klijavosti neprokljalo seme podvrgnuto je standardnom tetrazolium testu (ISTA, 1985) kako bi se odvojilo dormantno od mrtvog semena i utvrdio procenat životno sposobnog (vijabilnog) semena obe testirane vrste.

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.

REZULTATI I DISKUSIJA

Hemijska analiza biljnog ekstrakta. Dobijeni rezultati su pokazali da je sadržaj ukupnih fenola (TPC) 60,6 mg GAE g⁻¹ suvog ekstrakta, dok je za ukupni sadržaj flavonoida (TFC)

dobijena vrednost 186 mg QE g⁻¹ suvog ekstrakta stabla *C. campestris*. Jakovljević i sar. (2018) su dobili da se ukupan sadržaj fenola izolovanih iz semena *C. campestris* kretao u opsegu od 1,51 - 6,35 mg GAE mL⁻¹, a ukupan sadržaj flavonoida od 78 - 425 µg RU mL⁻¹ u zavisnosti od rastvarača. Zavisnost sadržaja ukupnih fenola od biljnog organa *C. campestris* iz kog je ekstrakt izolovan potvrdili su i Al-Gburi i sar. (2019) i zabeležili njihov sadržaj u semenu (11,094 mg g⁻¹) i stablu (8,137 mg g⁻¹). U istraživanjima Perveen i sar. (2013) gde su bile uključene dve vrste roda *Cuscuta*, su zabeležili sadržaj ukupnih fenola izolovanih iz stabla za *C. reflexa* (112,95 - 146,32 mg GAE 100 g⁻¹) i *C. europea* (97,68 - 189,68 mg GAE 100 g⁻¹) pri čemu je sadržaj ukupnih fenola varirao u odnosu na biljku domaćina. Slične rezultate su zabeležili i Tanruean i sar. (2015), gde je najveća vrednost ukupnog sadržaja fenola (65,45 mg GAE g⁻¹ ekstrakta) zabeležena u biljnom ekstraktu stabla uzetog sa *Streblus asper* kao domaćina.

Rezultati antioksidativne aktivnosti, odnosno neutralizacije DPPH radikala u odnosu na kontrolu prikazani su kao procenti inhibicije, gde je za IC₅₀ koja predstavlja koncentraciju ekstrakta potrebnog za inhibiciju 50% početne količine DPPH radikala dobijena vrednost 0,490 mg mL⁻¹. Kriva zavisnosti koncentracije ekstrakta i procenta inhibicije DPPH radikala prikazana je na Grafiku 1. Antioksidativna aktivnost suvog biljnog ekstrakta određena je i FRAP metodom, pri čemu je dobijena FRAP vrednost iznosila 131,5 µmol Fe²⁺ g⁻¹ suvog ekstrakta. Perveen i sar. (2013) su ustanovili da *C. reflexa* ima veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala (88,85 - 289,47 µg mL⁻¹) u odnosu na *C. europea* (273,72 - 669,37 µg mL⁻¹). Tanruean i sar. (2015) su zabeležili da koncentracija 400 µg mL⁻¹ ekstrakta *C. reflexa* (sa biljke domaćina *Streblus asper*) inhibira 59,85% DPPH radikala, a da je u istom slučaju FRAP vrednost 28,68 mg GAE g⁻¹ suvog ekstrakta.

Tabela 1. Inhibicija DPPH radikala (%)

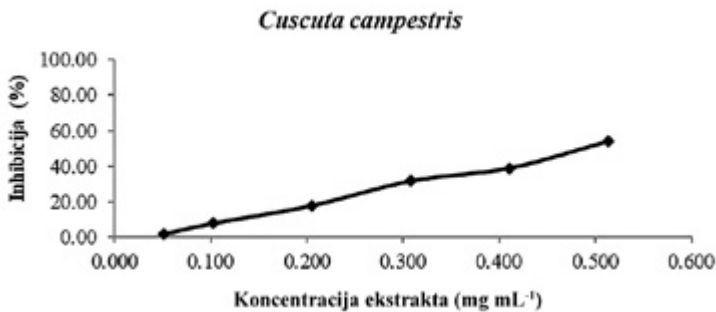
Table 1. Inhibition of DPPH radicals (%)

Koncentracija (mg mL ⁻¹) Concentration (mg mL ⁻¹)	Inhibicija DPPH radikala (%) Inhibition of DPPH radicals (%)
0,051	1,62
0,103	7,66
0,205	17,63
0,308	31,55
0,410	38,75
0,513	53,83
IC ₅₀ = 0,490 mg mL ⁻¹	

HPLC analizom biljnog ekstrakta stabla *C. campestris* utvrđeno je prisustvo 19 različitih fenola, a sa najvećim sadržajem su se izdvojili sledeći: kvercetin (5,62 ± 0,05 mg g⁻¹), katehin (3,71 ± 0,02 mg g⁻¹), diadzin (2,85 ± 0,03 mg g⁻¹), luteolin (1,82 ± 0,02 mg g⁻¹) i rutin (1,16 ± 0,02 mg g⁻¹). Alamgeer i sar. (2017) su HPLC analizom biljnog ekstrakta stabla *C. reflexa* ustanovili takođe najveći sadržaj kvercetina, ali pored njega i p-kumarne kiseline, galne kiseline, vanilne kiseline, kafene kiseline i ferulne kiseline.

Tabela 2. HPLC analiza biljnog ekstrakta
Table 2. HPLC analysis of the plant extract

Fenol (oznaka) Phenol (mark)	<i>Cuscuta campestris</i> (mg g ⁻¹ suvog ekstrakta) (mg g ⁻¹ dry extracts)
4-hidroksibenzoeva kiselina (4-HBA)	0,60 ± 0,01
Kafena kiselina (CA)	0,06 ± 0,01
Katehin (CAT)	3,71 ± 0,02
Cinamična kiselina (CIN)	0,54 ± 0,02
Diadzin (DAID)	2,85 ± 0,03
Epikatehin (EPI)	0,66 ± 0,01
Epigalokatehin (EPIG)	0,74 ± 0,02
Epigalokatehin galat (EPIG-G)	0,59 ± 0,02
Galna kiselina (GA)	0,07 ± 0,01
Genistin (GEN)	0,69 ± 0,02
Luteolin (LUT)	1,82 ± 0,02
Miricetin (MYR)	0,01 ± 0,01
p-kumarna kiselina (PCA)	0,35 ± 0,02
Protokatehična kiselina (PRCA)	0,36 ± 0,02
Kvercetin (QUE)	5,62 ± 0,05
Rutin (RUT)	1,16 ± 0,02
Vanilna kiselina (VA)	0,27 ± 0,01



Grafik 1. Kriva zavisnosti koncentracije ekstrakta i inhibicije DPPH radikala (%)

Figure 1. The dependence curve of the extract concentration and the inhibition of the DPPH radical (%)

Alelopatski uticaj biljnog ekstrakta stabla *C. campestris* na klijanje *A. retroflexus* i *P. oleracea*. Biljni ekstrakt izolovan iz stabla *C. campestris* primenjen u koncentracijama od 0,25%, 0,50%, 0,75% i 1% imao je značajan uticaj na klijavost semena *A. retroflexus* i *P. oleracea* (Tabela 3 i 4). U tretmanima sa koncentracijama biljnog ekstrakta 0,75% i 1% zabeležena je inhibicija klijavosti semena *A. retroflexus* od 68%, odnosno 88%. Nasuprot ovome, primenom niže koncentracije (0,50%) biljnog ekstrakta zabeležena je minimalna inhibicija (6%), dok je u tretmanu sa najnižom koncentracijom (0,25%) biljnog ekstrakta zabeležena stimulacija od 5% (Tabela 3). U skladu sa rezultatima testa klijavosti semena, dve najveće koncentracije (1% i 0,75%) biljnog ekstrakta dovele su do značajne inhibicije ranog porasta klijanaca *A. retroflexus* od 77%, odnosno 75% (Tabela 3). Inhibicije porasta klijanaca su zabeležene i pri nižim koncentracijama biljnog ekstrakta (0,50% - 39% i 0,25% - 25%), što ovaj parametar

izdvaja kao osetljiviji u odnosu na parametar klijavost semena. Analiza rezultata je potvrdila da postoje značajne razlike ($p < 0,05$) između kontrole i tretmana u svim koncentracijama (0,25%, 0,50%, 0,75% i 1%) za oba merena parametra (Tabela 3).

Tabela 3. Efekat biljnog ekstrakta iz stabla *C. campestris* na klijanje semena i rani porast klijanaca *A. retroflexus*
Table 3. Effects of *C. campestris* stem extracts on seed germination and early seedling growth of *A. retroflexus*

Parametar Parameter	Kontrola Control	Koncentracija biljnog ekstrakta Concentration of plant extracts			
		0,25%	0,50%	0,75%	1%
Vijabilno seme (%)	92,50 ± 2,12 _b	94,00 ± 2,64 _a	95,00 ± 2,93 _a	91,50 ± 2,59 _b	90,50 ± 1,98 _b
Ukupna klijavost (%)	88,00 ± 2,01 _b	92,00 ± 2,69 _a	83,00 ± 1,87 _c	28,00 ± 1,01 _d	10,50 ± 0,78 _e
Dužina klijanaca (cm)	5,09 ± 0,69 _a	3,81 ± 0,42 _b	3,09 ± 0,40 _c	1,29 ± 0,25 _d	1,16 ± 0,17 _d

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

Data are reported as means ± standard deviation. Differences were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) completed with Fisher's least significant difference (LSD) test, $P < 0,05$.

Analiza rezultata je pokazala da su semena *P. oleracea* manje osetljiva od semena *A. retroflexus*, jer je inhibicija klijanja semena u tretmanu sa najvišom koncentracijom (1%) biljnog ekstrakta iznosila 8%, a u tretmanima sa koncentracijama od 0,75% i 0,50% zabeležena inhibicija je bila 6%, odnosno 4%. Tretman sa najnižom koncentracijom (0,25%) biljnog ekstrakta nije izazvao inhibiciju koja se može zabeležiti (Tabela 4). Nasuprot ovome, inhibicija porasta klijanaca *P. oleracea* se kretala od 21 - 70% za koncentracije (0,50%, 0,75%, 1%) biljnog ekstrakta iz stabla *C. campestris*, dok je pri najnižoj koncentraciji (0,25%) biljnog ekstrakta inhibicija bila samo 2%. Statističke analize su potvrdile značajne razlike ($p < 0,05$) između kontrolne i tretmana sa višim koncentracijama (0,50%, 0,75%, 1%) biljnog ekstrakta, dok između kontrole i tretmana sa najnižom koncentracijom (0,25%) biljnog ekstrakta nisu zabeležene statistički značajne razlike (Tabela 4).

Tabela 4. Efekat biljnog ekstrakta iz stabla *C. campestris* na klijanje semena i rani porast klijanaca *P. oleracea*
Table 4. Effects of *C. campestris* stem extracts on seed germination and early seedling growth of *P. oleracea*

Parametar Parameter	Kontrola Control	Koncentracija biljnog ekstrakta Concentration of plant extracts			
		0,25%	0,50%	0,75%	1%
Vijabilno seme (%)	94,50 ± 1,89 _a	95,00 ± 2,51 _a	92,50 ± 1,76 _b	90,00 ± 1,58 _c	87,00 ± 1,34 _d
Ukupna klijavost (%)	94,50 ± 2,39 _a	94,50 ± 2,24 _a	90,50 ± 2,63 _b	89,00 ± 2,21 _b	87,00 ± 1,93 _c
Dužina klijanaca (cm)	2,48 ± 0,37 _a	2,42 ± 0,30 _a	1,97 ± 0,25 _b	1,48 ± 0,21 _c	0,73 ± 0,09 _d

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

Data are reported as means ± standard deviation. Differences were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) completed with Fisher's least significant difference (LSD) test, $P < 0,05$.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su potvrdili ranija istraživanja (Ashrafi et al., 2007; Othman et al., 2012), da se efekat alelohemikalija može zabeležiti i kod klijanja semena, ali da je uticaj na rani porast klijanaca izraženiji. Takođe, Bakar i sar. (2013) su ispitivali alelopatski uticaj biljnog ekstrakta stabla *C. campestris* rastvorenog u etanolu na klijanje semena *Raphanus*

sativus, *Lactuca sativa* i *Oryza sativa*, pri čemu su inhibicije klijanja semena zabeležili samo kod *L. sativa*, dok je porast klijanaca inhibiran kod sve tri biljne vrste.

ZAKLJUČAK

Analiza fenolnih jedinjenja u ovom istraživanju je pokazala da je biljni ekstrakt iz stabla *C. campestris* bogat izvor fenolnih i flavonoidnih jedinjenja sa izraženom antioksidativnom aktivnošću. Takođe, HPLC analizom je utvrđeno je prisustvo 19 različitih fenola, pri čemu su se kvercetin, katehin, diadzin, luteolin i rutin izdvojili sa najvećim sadržajem u biljnom ekstraktu. Osim toga, veće koncentracije (0,75% i 1%) biljnog ekstrakta ove parazitne cvetnice imale su inhibitorni efekat na ukupnu klijavost i dužine klijanaca semena *A. retroflexus* i *P. oleracea*. Dobijeni podaci ukazuju da biljni ekstrakt iz stabla *C. campestris* poseduje određeni alelopatski potencijal i da bi mogao biti prirodni izvor molekula za kontrolu korova.

ZAHVALNICA

Istraživanja u ovom radu realizovana su na osnovu ugovora o realizaciji i finansiranju naučno-istraživačkog rada NIO, evidencioni brojevi: 451-03-66/2024-03/200214 i 451-03-65/2024-03/200116.

LITERATURA

- Agha, A. M., Sattar, E. A., Galal, A.: Pharmacological study of *Cuscuta campestris* Yuncker, *Phytotherapy Research*, 10, 117-120, 1996.
- Alamgeer, Niazi, S. G., Utra, A. M., Qaiser, M. N., Ahsan, H.: Appraisal of anti-arthritic and nephroprotective potential of *Cuscuta reflexa*. *Pharmaceutical Biology*, 55, 792-798, 2017,
- Albuquerque, M., Santos, R., Lima, L., Filho, P. M., Nogueira, R., Ramos, C. C.: Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31, 379-395, 2011.
- Al-Gburi, B. K. H., Al-Sahaf, F. H., Al-Fadhal, F. A., Del Monte, J. P.: Detection of phytochemical compounds and pigments in seeds and shoots of *Cuscuta campestris* parasiting on eggplant. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25, 253-261, 2019.
- Ashrafi, Z., Mashhadi, H., Sadeghi, S.: Allelopathic effects of barley (*Hordeum vulgare*) on germination and growth of wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Pakistan Journal of Weed Science Research*, 13, 99-112, 2007.
- Bakar, B. H., Leong, T. S., Othman, M. R., Annuar, M. S. M., Awang, K.: Allelochemicals in *Cuscuta campestris* Yuncker. In the Proceedings of the 24th Asian-Pacific Weed Science Society Conference, Bandung, Indonesia, 2013.
- Flores-Sanchez, I. J., Garza-Ortiz, A.: Is there a secondary/specialized metabolism in the genus *Cuscuta* and which is the role of the host plant? *Phytochemistry Reviews*, 18, 1299-1335, 2019.
- Jakovljević, D. V., Vrvčić, M. M., Vrbničanin, S., Sarić-Krsmanović, M.: Phytochemical, free radical scavenging and antifungal profile of *Cuscuta campestris* Yunck. *Seeds. Chemistry Biodiversity*, 1, 1-12, 2018.

- Khanh, T. D., Cong, L. C., Xuan, T. D.*: Weed-Suppressing Potential of Dodder (*Cuscuta hygrophilae*) and its Phytotoxic Constituents. *Weed Science*, 56, 119-127, 2008.
- Krstić, N., Gajić Umiljendić, J., Đorđević, T., Šantrić, Lj., Sarić-Krsmanović, M.*: Alelopatijski potencijal biljnog ekstrakta zelenih plodova oraha (*Juglans regia* L.). *Acta herbologica*, 31 (2), 131-142, 2022.
- Li, Z. H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C. D., Jiang, D. A.*: Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules*, 15, 8933-8952, 2010.
- Macias, F. A., Mejias, F. J. R., Molinillo, J. M. G.*: Recent advances in allelopathy for weed control: from knowledge to applications. *Pest Management Science*, 75, 2413-2436, 2019.
- Othman, M. R., Leong, T. S., Bakar, B., Awang, K., Annuar, M. S. M.*: Allelopathic Potentials of *Cuscuta campestris* Yuncker Extracts on Germination and Growth of Radish (*Raphanus sativus* L.) and Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural Science*, 4, 57-63, 2012.
- Perveen, S., Bukhari, H. I., Qurat-Ul-Ain, Kousar, S., Rehman, J.*: Antimicrobial, Antioxidant and Minerals Evaluation of *Cuscuta europea* and *Cuscuta reflexa* Collected from Different Hosts and Exploring Their Role as Functional Attribute. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 3, 43-49, 2013.
- Rice, E. L.*: Allelopathy. 2^d Ed. Academic Press, Orlando, FL, 1984.
- Romeo, J. T., Weidenhamer, J. D.*: Bioassays for allelopathy in terrestrial plants. In K. F. Haynes and J. G. Millar (Eds.), *Methods in chemical ecology*. Kluwer Academic Publishing, Boston, pp. 179-211, 1999.
- Tanruean, K., Suwannarach, N., Lumyong, S.*: Determination of total phenolic contents and antioxidant potential of *Cuscuta reflexa* Roxb. Collected from different hosts. 7th International Science, Social Science, Engineering and Energy Conference, Phitsanulok, Thailand, 2015.
- <https://allelopathy-society.osupytheas.fr/> [28.06.2024.]

Allelopathic potential of plant extracts from the stem of *Cuscuta campestris* Yunck.

SUMMARY

Allelopathic processes involve interactions between living organisms via secondary metabolites (allelochemicals). *Cuscuta* species are known for their large production of chemical compounds characterized by various biological activities. This study aimed to test the allelopathic effects of plant extracts isolated from the stem of *Cuscuta campestris* on the germination and early seedling growth of two weed species (*Amaranthus retroflexus* and *Portulaca oleracea*). Additionally, the goals were to also conduct an analysis of the plant extracts and determine their antioxidant properties.

The chemical analysis has shown that the obtained plant extract is a rich source of phenolic compounds. HPLC analysis separated by content of the following compounds: quercetin (5.62 mg g⁻¹), catechin (3.71 mg g⁻¹), diadzin (2.85 mg g⁻¹), luteolin (1.82 mg g⁻¹), and rutin (1.16 mg g⁻¹). In addition, higher concentrations (0.75% and 1%) of the plant extract of this parasitic flower had an inhibitory effect on the germination and early growth of *A. retroflexus* and *P. oleracea* seeds. *A. retroflexus* proved to be a more sensitive test plant compared to *P. oleracea*, which is confirmed by the inhibition percentages of seed germination of 88% (*A. retroflexus*) and 8% (*P. oleracea*), i.e. the inhibition of seedling growth was 77% (*A. retroflexus*) or 70% (*P. oleracea*). The obtained results have shown the allelopathic properties of the stem extracts of the *C. campestris*.

Keywords: allelopathy, plant extract, phenols, *Cuscuta campestris*.