

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Petra Gregurić univ. bacc. ing. agr.

**UČINAK IZOTIOCIJANATA I FENOLNIH KISELINA NA *IN VITRO* KLIJANJE I POČETNI RAST KOROVNE VRSTE
*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA L.***

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za herbologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Šćepanović i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023/2024. Rad je izrađen u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Ekološki prihvatljivo suzbijanje ambrozije kombinacijom reduciranih doza herbicida i fenolnih kiselina“ (2023. – 2027.) voditeljice prof. dr. sc. Maje Šćepanović

Sadržaj rada

1. Uvod.....	1
2. Hipoteze i ciljevi istraživanja.....	6
3. Materijali i metode rada.....	7
3.1. Priprema sjemena ambrozije i test klijavosti.....	7
3.2. <i>In vitro</i> pokus.....	8
3.3. Statistička obrada rezultata.....	10
4. Rezultati rada.....	11
4.1. Izotiocijanati.....	11
4.2. Fenolne kiseline.....	15
5. Rasprava.....	18
6. Zaključci.....	23
7. Zahvale.....	24
8. Popis literature.....	25
9. Sažetak.....	33
10. Summary.....	34
11. Životopis.....	35

1. Uvod

Među biljnim štetočinjama, vodeći uzrok gubitka prinosa u poljoprivredi su korovi koji nanose usjevima direktne i indirektne štete (Ostojić, 2004). Ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia* L.) je najučestaliji korov kontinentalne Hrvatske (Šarić i sur., 2011.) čije suzbijanje iziskuje velike financijske troškove. Dodatan problem pri suzbijanju predstavlja i razvoj rezistentnih populacija ove vrste na određene aktivne tvari herbicida, dokazani i u Republici Hrvatskoj (Šćepanović i sur., 2020).

Uvođenje pokrovnih kultura u plodored jedan je od alternativnih oblika suzbijanja korova, a danas pogotovo aktualan zbog Europskog zelenog plana i zahtjeva za redukcijom unosa pesticida u okoliš. Pokrovni usjevi pomažu u potiskivanju korova povećanjem raznolikosti u natjecanju za resurse potrebne za rast te u ometanju ekoloških niša (Liebman, 2000). Ova mjera može značajno reducirati ili čak potpuno onemogućiti razvoj korova pa je posebice interesantna u ekološkoj proizvodnji (Bàrberi, 2002). Također je sjetva pokrovnih usjeva vrlo aktualna i u integriranoj biljnoj proizvodnji zbog povećane pojave na herbicide rezistentnih biotipova korova i općenito potencijalno negativnih ekotoksikoloških karakteristika herbicida (Büchi i sur., 2018). Istraživanja navode da je sjetvom pokrovnih usjeva moguće suzbiti čak 90% korovnih vrsta i samoniklih usjeva nakon žetve žitarica (Jabran i sur., 2015).

Osim što kompeticijski (oduzimanjem hrane, vode, svjetla i prostora) djeluju prema korovima, jedan od razloga njihovog inhibitornog učinka je posjedovanje alelokemikalija u biljnim dijelovima i biljnim ostacima (Farooq i sur., 2011.). Alelokemikalije su zapravo sekundarni metaboliti koji proizvode ove biljne vrste, a nakupljaju se u lišću, korijenu, sjemenkama i plodovima (Radosevich i sur., 1997). U tlo se otpuštaju ispiranjem ili izlučevinama korijena te razgradnjom biljnih ostataka (Bonanomi i sur., 2006). Ove alelokemikalije mogu potisnuti ili eliminirati druge biljne vrste pa su zbog svog inhibitornog potencijala privukle pozornost kao potencijalni, ekološki prihvatljivi herbicidi (Copping, 1998). Alelokemikalije su također vrlo atraktivne radi svojih prednosti u odnosu na sintetičke herbicide. Imaju kraće vrijeme poluraspada u tlu te se ne vežu na čestice tla pa su ekološki prihvatljiviji izbor u usporedbi sa sintetičkim herbicidima (Perotti i sur., 2020).

Poseban naglasak se stavlja na uporabu biljaka iz porodice Brassicaceae i to zbog visokih koncentracija alelokemikalija u ovim biljnim vrstama koje inhibitorno djeluju na rast korova. Novija istraživanja su pokazala kako vodeni ekstrakti biljaka porodice Brassicaceae (*Camelina sativa* L., *Sinapis alba* L., *Raphanus sativus* L.) inhibiraju klijanje te rani rast i

razvoj korovnih vrsta *Echinochloa curs-galli* . i *Setaria glauca* L. (Brijačak i sur., 2020) te *Ambrosia artemisiifolia* L. (Šćepanović i sur., 2021). Vodeni ekstrakti od vrsta porodice Brassicaceae samostalno ili u kombinaciji s drugim biljnim vrstama također su produljile vrijeme klijanja i smanjile duljinu radikule korovnih vrsta *Chenopodium album* L., *Matricaria chamomilla* L. i *Stellaria media* L. (Kunz i sur., 2016).

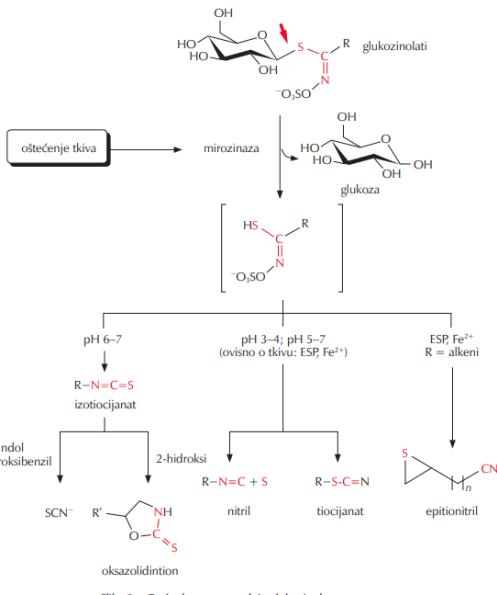
Sve biljne vrste ove porodice sadrže sekundarne metabolite – glukozinolate (Brown i Morra, 1997), biološki aktivne spojeve raznolikih struktura Pronađeni su kod 16 različitih biljnih porodica reda Capparales, od kojih je najznačajnija porodica Brassicaceae u kojima je utvrđena prisutnost 150 glukozinolata (Blažević i sur., 2020). To su organski anioni koji sadrže sumpor (Brown i Morra., 1997) i koje se može pronaći isključivo u dikotiledonim vrstama (Fenwick i sur., 1983).

Molekule glukozinolata građene su od β -D-tioglukoznog dijela povezanog sa sulfoniranim aldoksimom, koji je supstituiran bočnim lancem, čija svojstva ovise o aminokiselini koja je prekursor u odgovarajućem biosintetskom putu (Blažević i sur., 2020). Ovisno o biljnoj vrsti, strukture molekula i koncentracija glukozinolata mogu varirati (Müller, 2009). Zajedno s β -tioglukozidazama (mirozinazama), glukozinolati imaju obrambenu ulogu i odgovaraju na okolišne podražaje poput oštećenja ili prisutnosti patogena (Czerniawski i sur., 2021). Neki od procesa u koje su uključeni su biosinteza auksina (Fu i sur., 2016), posredovanje otvaranja stomata (Zhao i sur., 2008), a imaju i određenu ulogu kada je korijen biljaka pod stresom zbog soli (Martínez-Ballesta i sur., 2015).

Ovisno o aminokiselini koja je prekursor u bočnom lancu, glukozinolati se dijele u tri skupine. Alifatski (AG) su izvedeni od metionina, alanina, valina, leucina ili izoleucina, indolični (IG) izvedeni su od triptofana, a benzil glukozinolati od fenilalanina ili tirozina. (Czerniawski i sur., 2021). Istraživanja su pokazala kako IG glukozinolati kontroliraju ulazak patogenih gljiva u biljno tkivo (Chen i sur., 2020) te negativno utječu na kukce koji se hrane floemom (Kim i sur., 2008). S druge strane, BG glukozinolati se povezuju s rezistentnošću na nematode (Kabouw i sur., 2010; Potter i sur., 1999).

Sami glukozinolati posjeduju ograničenu biološku aktivnost dok uz pomoć biljnog enzima mirozinaze ne dođe do hidrolize (Borek et al., 1995). Upravo iz tog razloga je jako malo informacija dostupno o kemijskim vrijednostima i sudbini glukozinolata u tlu (Gimsing i Kirkegaard, 2008). Raspadom (inkorporacijom biljnih ostataka u tlo) i oštećenjem (hranjenjem kukaca) biljnog tkiva i u prisutnosti vode ovi se spojevi razdvajaju na glukozu i aglukone - nestabilne spojeve koji se nadalje raspadaju na nekoliko skupina spojeva (Chew,

1988; Gardiner i sur. 1999; Müller, 2009). Takvi spojevi su pokazali toksičan, antinutrititivan i alelopatski učinak (Chew, 1988). Jedna skupina takvih spojeva su izotiocijanati (ITC).



Slika 1. Opća shema razgradnje glukozinolata (Blažević i sur., 2020.)

Izotiocijanati su spojevi koji su toksični za razne organizme (Fenwick i sur., 1983).

Ovi produkti raspada glukozinolata se povezuju s fitotoksičnim, insekticidnim, nematocidnim i fungicidnim djelovanjem Brassicaceae vrsta (Borek i sur., 1995). Više od 50 ITC molekula je identificirano kao produkt hidrolize glukozinolata pomoću enzima mirozinaze. Prisutnost mirozinaze u tlu je tema koja se nalazi u više istraživanja. Potvrđeno je kako mirozinazu proizvode mikroorganizmi tla, posebno gljive (Rakariyatham i sur., 2005; Sakorn i sur., 2002). Neka istraživanja navode kako do aktivacije mirozinaze dolazi samo u prisutnosti biljaka koje posjeduju glukozinolate (Al-Turki i Dick, 2003; Borek i sur., 1996) dok je s druge strane jedno istraživanje pokazalo kako je mirozinaza aktivna u tlu u kojem takve biljke nisu bile prisutne (Gimsing i sur., 2006). Prema Petersenu i sur. (2001) izotiocijanati prisutni u pokrovnim biljakama iz porodice Brassicaceae imaju jak inhibirajući učinak na klijanje korovne vrste *Echninochloa crus-galli*. Metil izotiocijanat je aktivna komponenta metama, biološkog fumiganta koji se koristi za suzbijanje raznih štetočinja u tlu (Borek i sur., 1995). Teasdale i Taylorson (1986) navode kako manje doze metil izotiocijanata stimuliraju, ali i odlazu klijanje dormaintnog sjemena vrste *Digitaria sanguinalis* L., dok su veće doze letalne za dormaintno i nedormaintno sjeme. Iako su visoko toksični, izotiocijanati su iznimno hlapivi i nestabilni u tlu. Gardiner i sur. (1999) navode kako je nakon zaoravanja uljane repice

koncentracija izotiocijanata u tlu drastično opada u prvih 72 sata, dok nakon toga koncentracija ostaje relativno stabilna kroz izvjesno vrijeme.

Osim izotiocijanata, biološki vrlo aktivne alelokemikalije su **fenolni spojevi** (Kunz i sur., 2016) koji također imaju inhibirajući učinak prema korovima. Slično kao i glukozinolati, ovi sekundarni biljni metaboliti nastaju kao odgovor biljke na okolišne čimbenike i razaranje biljnog tkiva (Kefeli i sur., 2003). Biljne vrste porodice Brassicaceae također su izvor raznih fenolnih spojeva posebice zastupljeni u njihovom lišću i generativnim organima (Brijačak i sur., 2020). Novija istraživanja navode oko 15-ak različitih fenolnih spojeva prisutnih u biljnim tkivima vrsta porodice Brassicace od kojih su fenolne kiseline (galna, vanilinska, p-kumarinska, ferulinska, protokatehinska, *p*-hidroksibenzojeva, siringinska, klorogenska, kafeinska i sinapinska kiselina) najzastupljenije (Šćepanović i sur., 2021.). Svaku od fenolnih kiselina na molekularnoj razini karakterizira različit hidroksilirani aromatski prsten (Mandal i sur., 2010). Fenolni spojevi su u biljkama najčešće polimerizirane u većim molekulama poput lignina ili mogu u biljkama nastati kao glikozidi ili esteri u kombinaciji s drugim spojevima poput sterola, alkohola i sl. (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011).

Za razliku od izocijanata čiji bioherbicidni učinak je u literaturi vrlo skromno istražen, za u vodi topive fenolne spojeve postoji više podataka o *in vitro* inhibitornom učinku prema nekim korovnim vrstama. Tako Stupnicka-Rodzynkiewicz i sur. (2006) navode da je ferulinska kiselina u dozi $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ inhibira rast korovne vrste *Chenopodium album*, a *p*-hidroksibenzojeva, protokatekuinska te vanilinska kiselina reduciraju početni rast korovnih vrsta *Echinochloa crus-galli* i *Galinsoga parviflora* Cav. Fenolne kiseline (afeinska, siringinska i *p*-kumarinska, salicinska) izolirane iz tkiva vrste *Brassica nigra* L. također su inhibirale rast nekih korovnih vrsta (Li i sur., 2010., Almaghrabi, 2012.).

Za osjetljivost korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* prema fenolnim spojevima podaci postoje isključivo iz domaće literature. U *in vitro* uvjetima utvrđen je inhibitorni učinak *p*-kumarinske, vanilinske i ferulinske kiselina (Šćepanović i sur., 2022.). Ove fenolne kiseline korištene su u nekoliko puta (do 16 x) većim dozacija nego li su prirodno prisutne u tkivima Brassicaceae biljnih vrsta (Šćepanović i sur., 2021.). Najnovije istraživanje (Pismarović i sur., 2024.) uspoređuje inhibicijski učinak ovih fenolnih kiselina primijenjenih u istim dozacija te ukazuje da je *p*-kumarinska kiselina u dozi od 200×10^{-7} mola najjače inhibirala klijanje i *in vitro* rast ove korovne vrste.

Klorogenska kiselina je jedna od najdostupnijih fenolnih kiselina, a u prirodi se najviše nalazi u zelenoj kavi i čaju (Naveed i sur., 2018). Poznati su brojni biološki učinci ove

kiseline na razne žive organizme. Osim alelopatskih svojstava (del Moral i Muller, 1970.), ima i antibiotska (Farkas i Kiraly, 1962.) i antibiljojedna svojstva (Jones, 1971.). Također, dodavanjem biljnog materijala *Hlianthus annuus* L., koji sadrži značajnu količinu kloregenske kiseline, u tlo utvrđen je značajan inhibitorni učinak na klijavost sjemena *Amaranthus retroflexus* L. (Hall i sur., 1982). Slična svojstva sadrži i **p-hidroksibenzojeva** kiselina koja se u prirodi nalazi u raznim biljkama poput *Daucus carota* L., *Arabidopsis thaliana* L., i sl. (Manuja i sur., 2013). U nedavnim je istraživanjima utvrđeno kako p-hidroksibenzojeva kiselina ima određeni inhibitoran učinak na klijanje *Ambrosia artemisiifolia* (Šćepanović i sur., 2022).

Korovne vrste fenolne spojeve i izotiocijanate mogu usvajati podzemnim i nadzemnim dijelovima. Suzbijanje korova prilikom usvajanja podzemnim biljnim organima podrazumijevalo bi sjetvu i potom unošenje pokrovnih usjeva u tlo. Međutim, u poljskim uvjetima inhibitorni potencijal ovih spojeva podložan je učincima raznih okolišnih čimbenika (Kobayashi, 2004), poput mikroorganizama koji razgrađuju ili za svoj rast koriste fenolne spojeve ili vezanjem na minerale gline čime korovu bivaju nedostupnim za usvajanje (Li i sur., 2010). Kod izotiocijanata je također utvrđena njihova nestabilnost u tlu gdje se u roku od 24 h razgradi više od 90% (Brown i Morra, 1995), u ovisnosti o temperaturi i vlazi tla (Borek i sur., 1995). Tako su Petersen i sur. (2001) utvrdili prisutnost pet (alil 1, n-butil, 3-butenil, benzyl, dimetil-amino i 2-fenil) izotiocijanata u malču biljke *Brassica napus* L. ali je stabilnost ovih spojeva u tlu relativno niska jer podložni hidrolizi i volatilni, ovisno o vrsti spoja. Tako je u laboratorijskim uvjetima DT₅₀¹ za feniletil iznosio 16 h, a za n-butil manje od 1 h. U skladu s tim, učinak ovih inhibitornih spojeva korisnije je istražiti primjenom izravno na nadzemne biljne dijelove (listove) ciljanih korova kao folijarni bioherbicid (Scavo i Mauromicale, 2020).

Većina autora navodi da učinak prirodnih spojeva poput fenolnih kiselina i izotiocijanata na korovne vrste značajno ovisi o primijenjenoj dozaciji ovih spojeva ali i o samom spoju. Također učinak ovisi i o samoj korovnoj vrsti (Hassan i sur., 2012.). Iako je *Ambrosia artemisiifolia* ekonomski značajna korovna vrsta u poljoprivredi i zbog alergene peludi veliki javno zdravstveni problem, relativno je slabo istražena njena osjetljivosti prema prirodnim spojevima, a posebice prema izotiocijanatima. Prema dostupnim informacijama iz literature, ne postoje podaci o inhibicijskom učinku fenolnih kiselina - klorogenske i p-hidroksibenzojeve kiseline kao ni o izotiocijanatnim spojevima.

¹ Poluvijek raspada, broj dana(sati) potreban da se spoj razgradi za 50%

2. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Temeljem pregleda literature i dosadašnjih istraživanja hipoteze ovog *in vitro* istraživanja su:

- 1.) Vodene otopine fenolnih kiselina (klorogenska i *p*-hidroksibenzojeva) i izotiocionata (fenil i metil izotiocianat) inhibirat će klijavost, duljinu hipokotila i radikule korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L
- 2.) Inhibitorni učinak vodenih otopina fenolnih kiselina i izotiocianata prema vrsti *Ambrosia artemisiifolia* značajno će se razlikovati u ovisnosti o primijenjenoj dozi i o vrsti primijenjenog spoja.

Cilj rada je u *in vitro* uvjetima utvrditi učinak fenolnih kiselina i izotiocianata na klijanje i početni rast ambrozije u *in vitro* uvjetima

Specifični ciljevi istraživanja su:

- 1) Utvrditi klijavost, duljinu radikule te duljinu hipokotila vrste *Ambrosia artemisiifolia* pri različitim dozama fenolnih kiselina (klorogenska i *p*-hidroksibenzojeva) i izotiocianata (fenil i metil izotiocianat)
- 2) Procijeniti efektivnu dozu svakog istraživanog spoja koja za 50% (ED_{50}) i 90% (ED_{90}) u *in vitro* uvjetima inhibira klijanje ili početni rast vrste *Ambrosia artemisiifolia*

3. Materijali i metode rada

Dvofaktorijski *in vitro* pokus proveden je u laboratoriju Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta s ciljem utvrđivanja učinka fenolnih kiselina i izotiocianata na klijanje i početni rast ambrozije.

3.1. Priprema sjemena ambrozije i test klijavosti

Sjeme ambrozije sakupljeno je 2021. na više lokacija kontinentalne Hrvatske te je očišćeno i hladno skladišteno (4°C) do početka istraživanja. Prije početka provođenja pokusa sjeme svih populacija ambrozije ručno je kalibrirano, odnosno sortirano prema veličini i boji i izuzeto je prazno sjeme koje je provjereno pritiskanjem sjemena pincetom i uklanjanjem mekanog sjemena (Guillemin i Chauvel, 2011). Samo je to ujednačeno sjeme i ono sjeme koje vizualno nije imalo oštećenja od predadora korišteno u pokusu. Na svim kalibriranim populacijama sjemena ambrozije proveden je test klijavosti. U petrijeve zdjelice promjera 90 mm, na filter papir, dodano je 4 mL destilirane vode te potom postavljeno po 25 sjemenki ambrozije. Petrijeve zdjelice su zatim zatvorene parafilmom kako bi se hermetizirale i spriječilo isparavanje te stavljene u klima komoru (HPP 108, Memmert, Schwabach, Njemačka) na konstantne uvjete optimalne za rast ambrozije: 12h dan/12h noć s izmjenom temperature $15/25^{\circ}\text{C}$ uz 70% vlažnosti. Nakon 10 dana utvrđen je broj proklijali sjemenki ambrozije (sjeme koje je imalo vidljivu radikulu $> 1 \text{ mm}$) te izračunata klijavost. Za nastavak istraživanja izabrana je populacija ambrozije s lokacije Posavski Bregi (45.6842 0 N, 16.3515 0 E) koja je imala klijavost veću od 70%.



Slika 2. Čišćenje i kalibracija sjemena ambrozije
Foto: Gregurić, P. (2024.)

3.2. In vitro pokus

U *in vitro* istraživanju primijenjeno je sedam koncentracija metil i fenil izotiocijanata te sedam doza klorogenske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline (Sigma-Aldrich®²) na klijanje i početni rast korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* (Tablica 1).

Tablica 1. Izotiocijanati i fenolne kiseline korištene u istraživanju

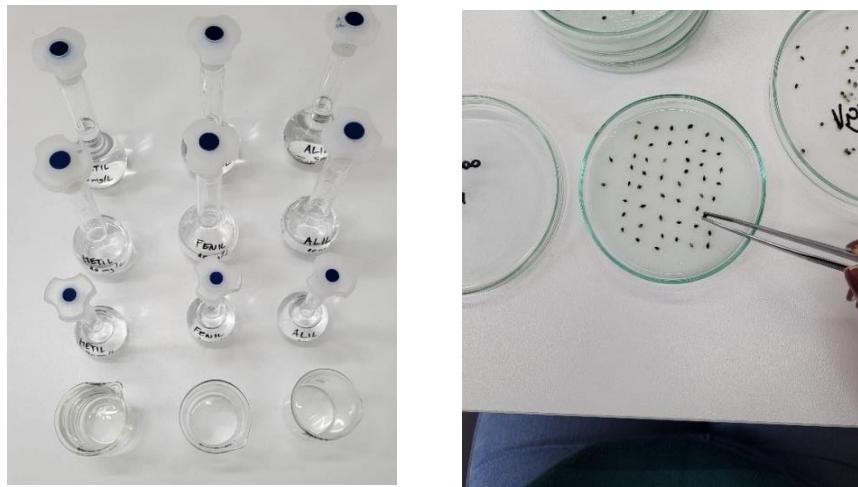
Fenolne kiseline/Izotiocijanati	Koncentracija izotiocijanata (mg mL⁻¹)						
	Doza fenolnih kiselina (10⁻⁷ mol)						
Metil	2,5	5	10	20	40	80	160
Fenil							
klorogenska	25	50	100	200	400	600	800
<i>p</i> -hidroksibenzojeva							

Doze fenolnih kiselina (25 - 800 x 10⁻⁷ mol) koje su korištene u ovom istraživanju odabrane su temeljem prethodnih istraživanja (Šćepanović i sur., 2022., Pismarović i sur. 2024) na istoj korovnoj vrsti, a koncentracije izotiocijanata (2,5 – 160 mg mL⁻¹) preuzete su iz Petersen i sur. (2001) testirane na korovnoj vrsti *Echninochloa crus-galli*.

Priprema otopina

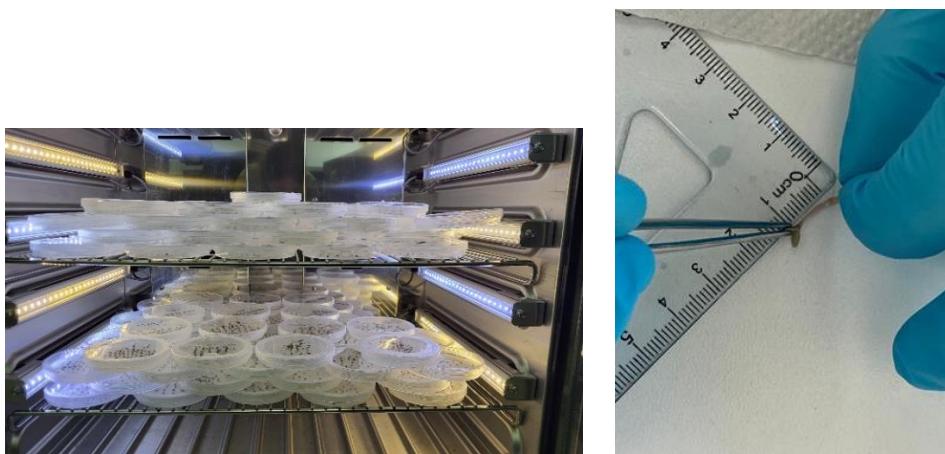
Fenolne kiseline i izotiocijanati zasebno su otopljeni, a otopine su pripremane miješanjem najvećih doza/koncentracija fenolnih spojeva odnosno izotiocijanata u 100 mL destilirane vode. Niže doze dobile su se razrjeđenjem ishodišne otopine. Sve pripremljene otopine su potom homogenizirane u ultrasoničnoj kupelji (Bandelin, Sonorex TK 52). Zbog dobre topivosti, fenolne kiseline otopljene su samo u destiliranoj vodi. Izotiocijanati nasuprot su spojevi slabije topivi u vodi (Bangrawa i Norsworthy, 2016.) stoga je u ove otopine dodatno 0,4% metanola (Petersen i sur., 2001). Prije postavljanja pokusa s izotiocijanatima testirana je klijavost sjemena ambrozije koristeći 0,4%tnu otopinu metanola gdje nije utvrđena inhibicija klijavosti ambrozije.

² Čistoće fenolnih kiselina: *p*-hidroksibenzojeva kiselina 99%, klorogenska>97
Čistoće izotiocijanata: metil izotacionat 97%, fenil izoticianat 98%
(<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en>)



Slika 3. i 4. Priprema otopina i sjetva sjemena ambrozije
Foto: Gregurić, 2024.

In vitro pokus postavljen je na isti način za fenolne kiseline i izotiocijanate kao što je opisano u poglavlju 3.1., osim što je u svakoj petrijevoj zdjelici posijano po 50 sjemenki ambrozije. U pokusu s fenolnim kiselinama kontrolni tretman predstavlja sjeme ambrozije u destiliranoj vodi, a kod izotpcionata u 0,4%noj otopini metanola. Sve petrijeve zdjelice su zatvorene parafilmom te postavljene u klima komoru (HPP 108, Memmert, Schwabach, Njemačka) na optimalan režim za klijanje ambrozije (poglavlje 3.1.). Nakon 14 dana utvrđen je broj proklijalih sjemenki ambrozije te na 10 reprezentativnih klijanaca izmjerena duljina radikule i hipokotila ambrozije.



Slika 5. i 6. Petrijeve zdjelice u klima komori i mjerjenje duljine hipokotila i radikule
Foto: Gregurić, 2024.

Inhibicija klijanja i početnog rasta ambrozije (duljina radikule i hipokotila te masa klijanaca) izračunata je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = [(X_c - X_t)/X_c] \times 100 \text{ gdje je:}$$

X_c - % klijavosti i početnog rasta ambrozije na kontroli

X_t - % klijavosti i početnog rasta ambrozije na tretmanu.

3.3. Statistička obrada rezultata

Dvofaktorijski pokus postavljen je po shemi slučajni blokni raspored u četiri ponavljanja te je ponovljen dva puta. Prvi faktor u pokusu je vrsta spoja, a drugi doza spoja. Pokusi su statistički obrađeni odvojeno, dvosmjernom analizom varijance za fenolne kiseline i dvosmjernom analizom varijance za izotiocijanate. Ukupna klijavost, duljina radikule i hipokotila ambrozije obrađeni su dvosmjernom analizom u programu R (R verzija 4.0.0, 24.4.2020). Nakon signifikantnog F testa za usporedbu srednjih vrijednosti korišten je *post hoc* Tukey test.

Na osnovi učinka redukcije duljine radikule ambrozije izračunate su i nacrtane log-logaritamske krivulje osjetljivosti ambrozije u odnosu na primjenjenu dozu fenolnih kiselina ili izotiocijanata te procijenjene ED_{50} i ED_{90} ³ vrijednosti. Krivulje su izračunate u programu R u drc (*dose response curve*) paketu (Ritz i sur., 2015).

³ Efektivna doza – doza potrebna da za 50 ili 90% reducira mjerene parametre ambrozije

4. Rezultati rada

4.1. Izotiocijanati

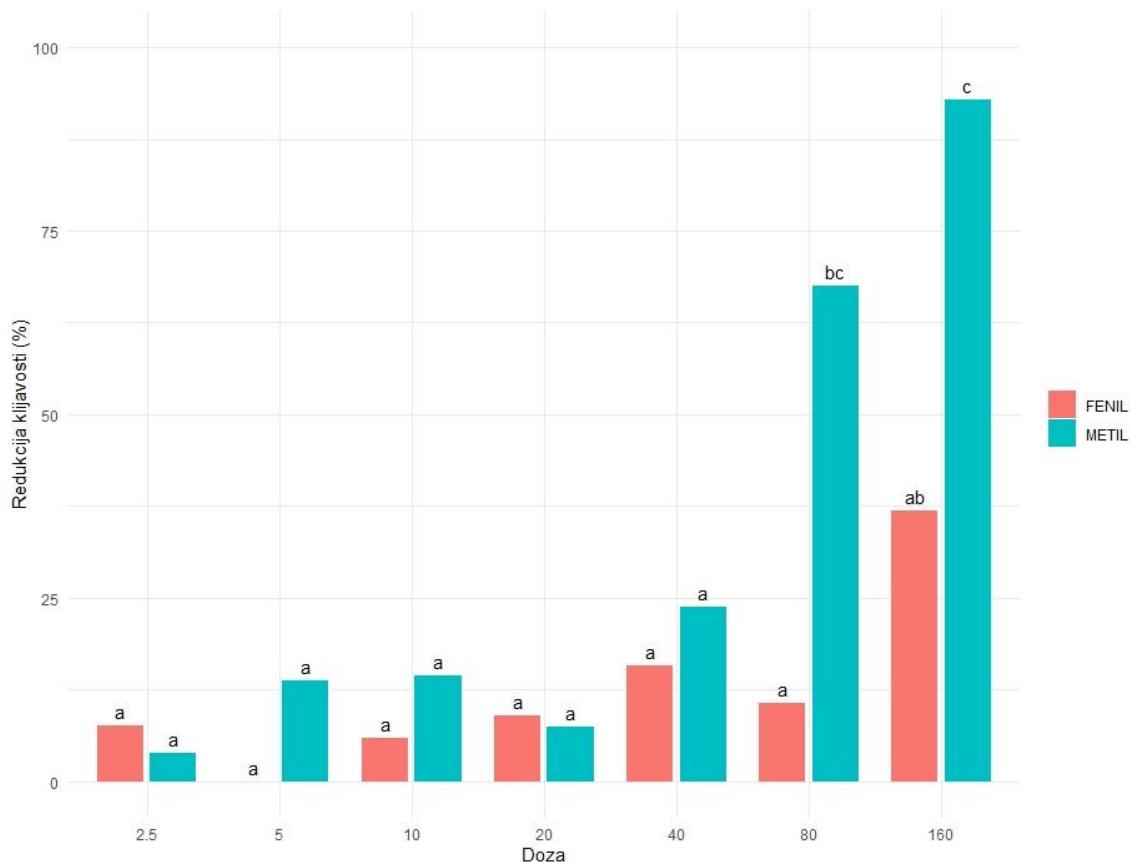
Analizom rezultata dvosmjerne analize varijance utvrđene su značajne razlike u svim mjeranim parametrima ambrozije u ovisnosti o vrsti izotiocijanata (ITC) i primjenjenim koncentracijama (Tablica 1). Tako je utvrđena visoko značajna razlika u redukciji klijavosti, redukciji duljine radikule i hipokotila u ovisnosti je li primijenjen metil ili fenil izotiocijanat. Između koncentracija izotiocijanata utvrđena je visoko značajna razlika u sva tri mjerena parametra početnog rasta ambrozije. Također je za sve mjerene parametre ambrozije utvrđena značajna interakcija izotiocijanat x koncentracija izotiocijanata.

Tablica 1. Dvosmjerna analiza varijance za redukciju klijavosti, duljine radikule i duljine hipokotila ambrozije pri istraživanim koncentracijama izotiocijanata

Izvor varijabilnosti	N-1	% redukcija		
		Klijavost	Duljina radikule	Duljina hipokotila
Izotiocijanati (I)		***	***	***
Koncentracija izotiocijanata (K)	6	***	***	***
I x K	6	**	**	***

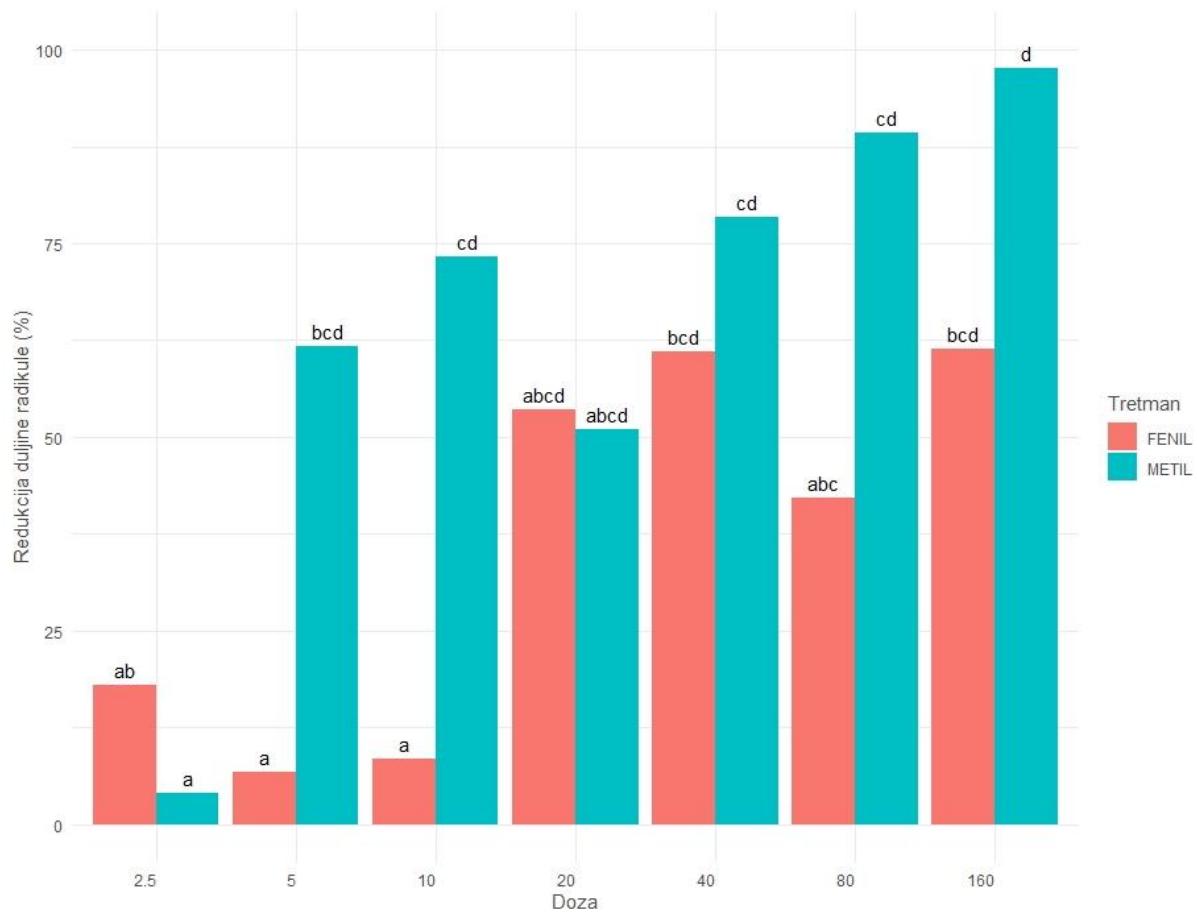
Oznake signifikantnosti za p vrijednost: <0.001 = *** ; <0.01 = **; ns = nesignifikantno

U grafu 1. prikazana je redukcija klijavosti ambrozije nakon *in vitro* primjene sedam različitih koncentracija izotiocijanata. Klijavost ambrozije značajno je ovisila i o vrsti izotiocijanata kao i o primjenjenim koncentracijama. Tako je klijavost značajno bolje reducirana primjenom viših koncentracija (80 i 160 mg mL⁻¹) metil ITC-a. Primjenom 160 mg mL⁻¹ metil ITC-a utvrđeno je 89.8%tna, a primjenom 80 mg mL⁻¹ 50.6%tna redukcija klijavosti ambrozije. Između ove dvije doze metil ITC-a nije utvrđena značajna razlika. Pri nižim koncentracijama (2.5 – 40 mg mL⁻¹) metil ITC-a klijavost je bila značajno slabije reducirana i između tih koncentracija nije utvrđena značajna razlika (2.4 – 17.8%tna redukcija). Nasuprot tome primjena fenil ITC-a nije značajno reducirala klijavost ambrozije u odnosu na kontrolni tretman pri niti jednoj istraživanoj koncentraciji.



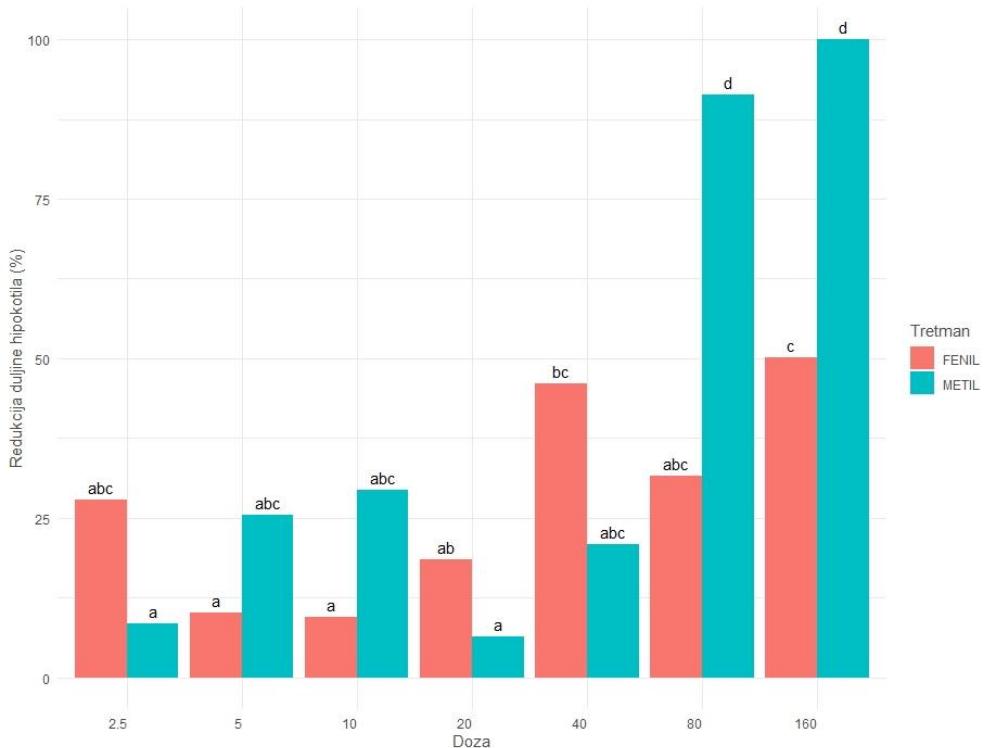
Graf 1. Redukcija kljavosti ambrozije nakon *in vitro* primjene otopina metil i fenil ITC-a u različitim koncentracijama

U grafu 2. prikazana je redukcija duljine radikule ambrozije tretirane različitim koncentracijama metil i fenil ITC-a (Tablica 1). Samo je kod najniže koncentracije metil ITC-a utvrđena značajno manja redukcija radikule u odnosu na ostale koncentracije gdje se radikula ambrozije reducirala od 51% (20 mg mL^{-1}) do 98% (160 mg mL^{-1}). Primjenom fenil ITC-a u koncentraciji 160 mg mL^{-1} ostvarena je redukcija radikule od 61% i statistički se nije razlikovala od primjene metil ITC-a u istoj koncentraciji. Također se koncentracijama od 20 i 40 mg mL^{-1} fenil izotiocijanata ostvarila redukcija kljavosti od 53 i 61% i statistički se nije razlikovala od primjene najviše koncentracije (160 mg mL^{-1}) metil izotiocijanata. Sumirano, radikula ambrozije iskazala je visoku osjetljivost prema oba izotiocijanata u svim koncentracijama ≥ 10 i 20 mg mL^{-1} .



Graf 2. Redukcija radikule ambrozije nakon *in vitro* primjene otopina metil i fenil izotiocianata u različitim koncentracijama

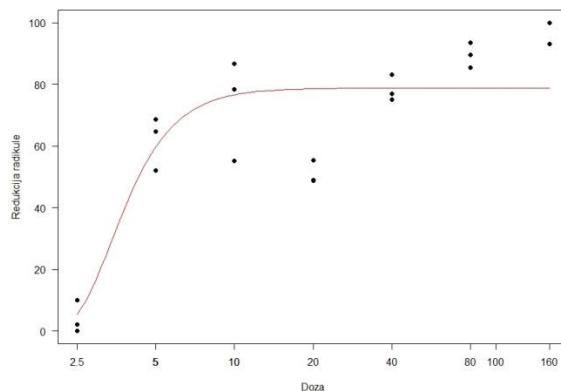
U grafu 3 prikazana je redukcija hipokotila ambrozije nakon *in vitro* primjene sedam različitih koncentracija izotiocianata. Sličan trend kao i kod redukcije klijavosti, uočen je i kod redukcije duljine hipokotila ambrozije. Nije utvrđena značajnih razlika između izotiocianata primijenjenih u koncentracijama od 2,5 do 40 mg mL^{-1} te se redukcija hipokotila kretala od 7 do 38%. Međutim, primjenom 80 i 160 mg mL^{-1} metil ITC-a utvrđena je značajno bolja redukcija hipokotila (83,8 i 100%). U ovim višim koncentracijama fenil ITC nije značajno bolje reducirao hipokotil ambrozije u odnosu na niže koncentracije ovog spoja, što je bio slučaj kod metil ITC-a.



Graf 3. Redukcija hipokotila ambrozije nakon *in vitro* primjene otopina metil i fenil izotiocianata u različitim koncentracijama

Logističkom krivuljom procijenjena je doza metil izotiocianata potrebna da za 50% i 90% (EC_{50} i EC_{90}) reducira duljinu radikule ambrozije (Graf 4). S obzirom da između dozacija fenil izotiocianata nisu utvrđene razlike ni u jednom mјerenom parametru nije bilo moguće za taj izotiocianat izraditi krivulju. Temeljem dobivenih podataka model je procijenio efektivne koncentracije metil izotiocianata:

$$EC_{50} = 3.77944 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0.51205 \text{ i } EC_{90} = 6.7241 \text{ mg mL}^{-1} \pm 2.3018.$$



Graf 4. Dose-response krivulja redukcije radikule ambrozije tretirane metil izotiocijanatom

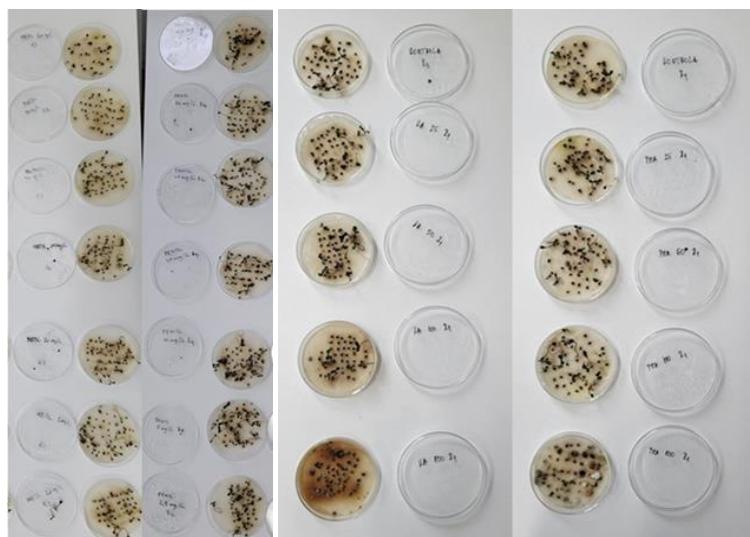
4.2. Fenolne kiseline

Analizom varijance nisu utvrđene značajne razlike u kljavosti ambrozije primjenom različitih doza fenolnih kiselina (klorogenske i *p*-hidroksibenzojeve). Međutim, redukcija radikule i hipokotila ambrozije značajno se razlikovala u ovisnosti o primijenjenim dozama fenolnih kiselina dok između samih kiselina nije utvrđena značajna razlika. Prosječno je radikula ambrozije bila reducirana za 43% primjenom klorogenske kiseline i 39,6 % primjenom *p*-hidroksibenzojeve, a hipokotil za 23% kod klorogenske i 20% kod *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Također, nije utvrđena značajna interakcija fenolne kiseline x doza fenolnih kiselina stoga su u grafu 5 i 6 prikazane uprosječene vrijednosti redukcije radikule i hipokotila za istraživane doze fenolnih kiselina.

Tablica 2 Dvosmjerna analiza varijance za redukciju kljavosti, radikule i hipokotila ambrozije tretiranu različitim dozama fenolnih kiselina

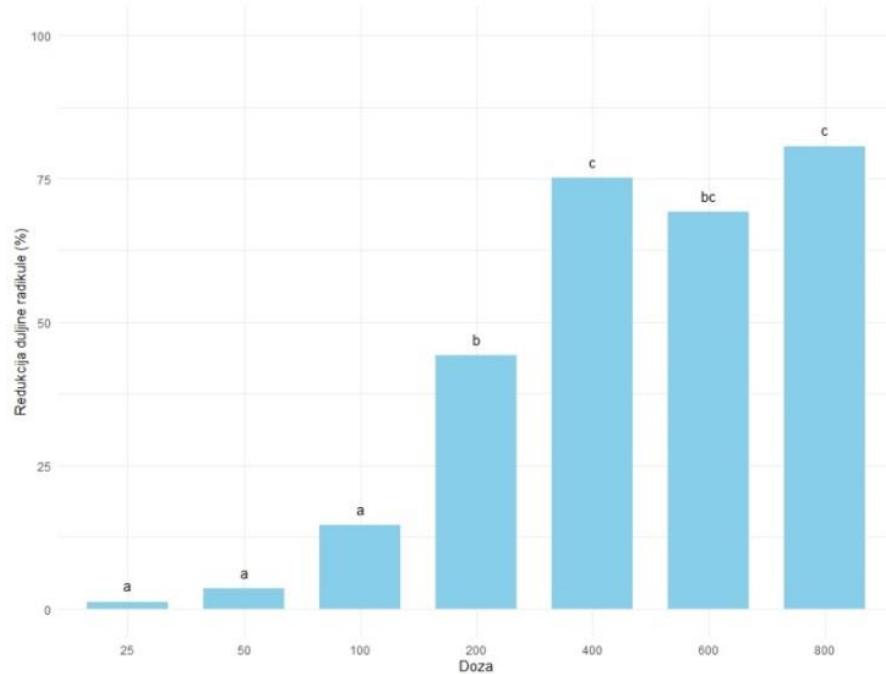
Izvor varijabilnosti		% redukcija		
	N-1	Klijavost	Duljina radikule	Duljina hipokotila
Fenolne kiseline (F)	1	ns	ns	ns
Doza fenolnih kiselina (D)	6	ns	***	*
F x D	6	ns	ns	ns

Oznake signifikantnosti za p vrijednost: <0.001 = *** ; <0.05 = *; ns = nesignifikantno



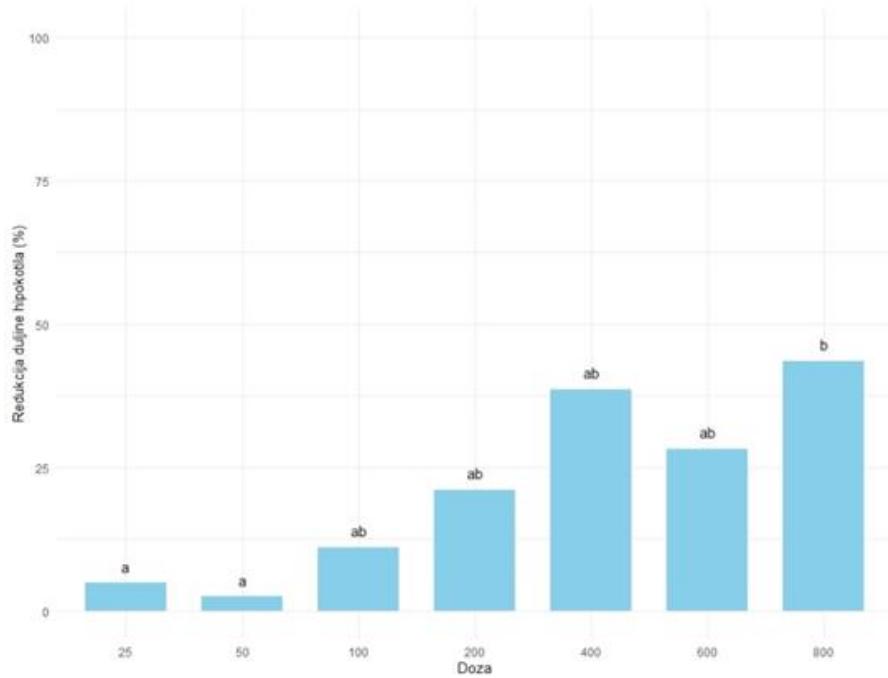
Slika 7. *In vitro dose-response* pokus sa sedam doza klorogenske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline

U grafu 4 prikazane su prosječne redukcije radikule ambrozije tretirane fenolnim kiselinama u različitim dozama. Primjenom $400, 600$ i 800×10^{-7} mola klorogenske i p-hidroksibenzojeve kiseline ostvarena je značajno bolja redukcija radikule (oko 75%) u odnosu na niže doze ($25 - 100 \times 10^{-7}$ mola).



Graf 4. Prosječna redukcija duljine radikule ambrozije u ovisnosti o primijenjenim dozama fenolnih kiselina

U grafu 5 prikazane su prosječne redukcije hipkotila radikule ambrozije tretirane fenolnim kiselinama u različitim dozama. Kod ovog parametra, značajna razlika u redukciji hipokotila ambrozije utvrđena je samo između najviše doze (800×10^{-7} mola) i najnižih doza (25 i 50×10^{-7} mola). Primjenom ostalih doza fenolnih kiselina nije utvrđena značajna razlika u redukciji hipokotila i ona se prosječno kretala od $20 - 45\%$.

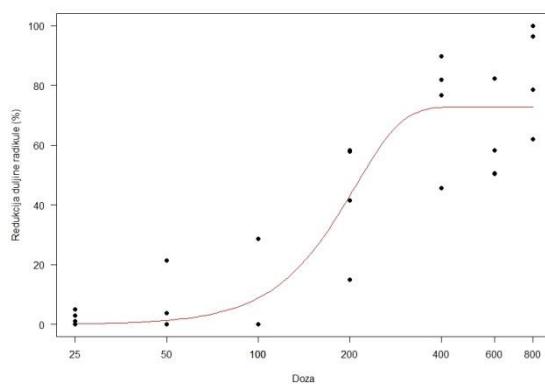


Graf 5. Prosječna redukcija duljine hipokotila ambrozije u ovisnosti o primijenjenim dozama fenolnih kiselina

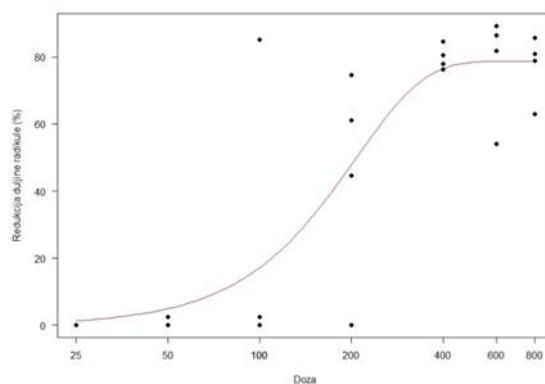
Logističkom krivuljom procijenjena su doza klorogneske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline potrebna da za 50% i 90% (ED_{50} i ED_{90}) reduciraju duljinu radikule ambrozije (Graf 6 i 7). Temeljem dobivenih podataka model (Weibull funkcija) je procijenio efektivne doze (ED) za fenolne kiseline.

Klorogenska kiselina: $ED_{50} = 171,5 \times 10^{-7} \text{ mol} \pm 0,51205$ i $ED_{90} = 319,5 \times 10^{-7} \text{ mol} \pm 85$

P-hidroksibenzojeva kiselina: $ED_{50} = 182,71 \times 10^{-7} \text{ mol} \pm 1$ i $ED_{90} = 280,8 \times 10^{-7} \text{ mol} \pm 67,7$



Graf 6. Dose response krivulja redukcije radikule ambrozije tretirane klorogenskom kiselinom



Graf 7. Dose response krivulja redukcije radikule ambrozije tretirane *p*-hidroksibenzojevom kiselinom

5. Rasprava

Europska Komisija u sklopu strategije Europski zeleni plan zahtjeva preobrazbu gospodarstva EU za održivu budućnost, s posebnim naglaskom na smanjenje ovisnosti o pesticidima zbog onečišćenja tla, voda i zraka te smanjenja bioraznolikosti. Jedan od mogućih alternativnih načina potiskivanja štetnih organizama jest primjena sekundarnih metabolita biljnih vrsta (Alemu i sur., 2014). Od oko 10 000 do danas identificiranih molekula sekundarnih metabolita pripada u polifenole (Podolska i sur., 2021), a među njima biološki vrlo aktivne su fenolne kiseline (Tesio i Ferrero, 2010). Biološki aktivni spojevi, u visokim koncentracijama prisutni u vrstama iz porodice Brassicaceae su i glukozinolati čiji razgradni spojevi (izotiocianati) posjedu inhibicijski učinak prema korovima (Brown i Morra, 1995).

Prvi korak nakon izolacije prirodnih spojeva iz biljnih tkiva (Šćepanović i sur., 2021., Petersen i sur., 2001.) je *in vitro* utvrđivanje njihovog inhibitornog potencijala prema korovnim vrstama. Cilj ovog *in vitro* istraživanja bio je utvrditi bioherbicidni učinak fenolnih kiselina (klorogenska i *p*-kumarinska) i izotiocianata (metil i fenil) na klijanje i početni rast ambrozije. Ambrozija kao testna vrsta odabrana je s obzirom na njen ekonomski značaj u poljoprivredi i javnom zdravstvu (Essl i sur., 2015) ali i zbog utvrđene rezistentnosti na neke herbicide (Heap, 2024., Šćepanović i sur., 2020). Ambrozija je kao testna vrsta relativno zahtjevna za ovakve tipove istraživanja, jer je u usporedbi s nekim drugim sitnosjemenim korovnim vrstama (Brijačak i sur., 2020, Gomaa i sur., 2014; Batish i sur., 2009) manje osjetljiva na alelokemikalije (Šćepanović i sur., 2022.).

Rezultati ovog *in vitro* istraživanja ukazuju da obje skupine spojeva inhibiraju klijanje i početni rast ambrozije. Time je ostvarena **prva hipoteza** ovog istraživanja koja je pretpostavljala da će i izotiocianati i fenolne kiseline inhibirati klijavost, duljinu radikule i hipokotila ambrozije. Međutim, inhibitorni učinak obje skupine spojeva značajno je ovisio o primijenjenoj dozi ali i o vrsti samog spoja čime je ispunjena i **druga hipoteza** ovog istraživanja. To je u suglasju s većinom literaturnih podataka koji navode da učinak fenolnih kiselina i drugih prirodnih spojeva značajno ovisi o njihovoj primijenjenoj koncentraciji (Šćepanović i sur., 2022. Reigosa i sur., 1999.).

U ovom istraživanju su se tako samo primjenom najviših koncentracija oba **izotiocianata** (80 i 160 mg L $^{-1}$) postigli inhibitorni učinci prema ambroziji. Međutim, *metil izotiocianat* je ostvario inhibirajući učinak prema ambroziji i primjenom nižih koncentracija, što nije bio slučaj kod fenil izotiocianata. Tako je radikula ambrozije bila značajno skraćena

već prilikom primjene 20 mg L^{-1} metil ITC-a (53%), a gotovo potpuno reducirana primjenom najviše doze (160 mg L^{-1}) s 98% redukcije (graf 2). Slično je utvrđeno i mjereći klijavost i hipokotil ambrozije gdje je primjenom 80 i 160 mg L^{-1} metil ITC-a utvrđena redukcija za preko 85% (graf 1 i 3). Iako su svi mjereni parametri početnog rasta ambrozije iskazali visoku osjetljivost prema metil ITC-u, radikula je iskazala najveću osjetljivost odnosno značajno je skraćena u odnosu na kontrolni tretman već pri 20 mg L^{-1} . Činjenica da je radikula parametar ranog klijanja koji je najosjetljiviji na inhibitorne učinke već je u literaturi objašnjeno učinkom spojeva na inhibiciju stanične diobe i povećanom debljinom korijena u izravnom kontaktu s alelokemikalijama (Heidarzade, 2012., Reigosa, 1999).

I primjena fenil ITC-a iskazala je inhibirajući učinak prema ambroziji, ali radikula kao najosjetljiviji parametar je bila reducirana za 61% tek primjenom najviše koncentracije odnosno 160 mg L^{-1} . Ovi *in vitro* rezultati ističu metil izotiocijanat kao potentniji inhibitorni spoj prema ambroziji u odnosu na fenil izotiocijanat. Razlika u volatilnosti moguće je jedan od razloga boljeg učinka na ambroziju metila u odnosu na fenil izotiocijanat. Sarwar i sur. (1998) navode kako se hlapivost izotiocijanata povećava smanjenjem molekularne mase, a molekularna masa metila ($73,12 \text{ g mol}^{-1}$) je gotovo dvostruko manja od fenil izotiocijanata ($135,19 \text{ g mol}^{-1}$). Isto tako autori navode da su alifatski (metil) izotiocijanati generalno hlapljiviji od aromatskih (fenil). Tako je za metil izotiocijanat u *in vitro* uvjetima utvrđena potpuna degradacija već za pet do sedam dana, a polovica metila se razgradila već za 1-2 dana (Teasdale i Taylorson, 1986.)

Dosadašnja istraživanja, vezana za izotiocijanate, najčešće su bila provođena s pretpostavkom inhibirajućeg učinka pokrovnih kultura jer izotiocijanati dospijevaju u tlo razgradnjom glukozinolata, spojeva koji se nalaze u tkivima ovih biljnih vrsta. Tako su Peterson i sur. (2001.), nakon inkorporacije *Brassica rapa* u tlo, utvrdili pet izotiocijanatnih spojeva: alil, *n*-butil, 3-butenil, benzil, dimethylamino i 2-feniletil -ITC. Većina izotiocijanatnih spojeva je osjetljiva na hidrolizu i dosta volatilna, *n*-butil se već nakon 2 h razgradi za 95% dok je feniletil manje volatilan pa je za njega utvrđena DT₅₀ 16 h dok je za *n*-butil manje od 1 h (Petersen i sur., 2001.). Navedeno opravdava *in vitro* istraživanja u kojima je sjeme testnih vrsta (ambrozija) direktno uronjeno u otopine izotiocijanatnih spojeva, a što je značajno slabije u literaturi istraženo. Ipak, postoji nešto informacija o metil izotiocijanatu koji je produkt razgradnje metama, zemljišnog fumiganta koji se koristi za suzbijanje raznih štetočinja u tlu. Primjenom vodenih otopina koje su sadržavale 6, 8 i 10 mM metil izotiocijanata su gotovo u potpunosti ili potpuno inhibirale klijanje korovne vrste *Digitaria sanquinalis* L (Teasdale i Taylorson, 1986.). Bangrawa i Norsworthy (2016) uspoređivali su

inhibitoran učinak metil, alil i fenil izotiocijanata na korovnu vrstu *Cyperus rotundus* L. pod dvije različite vrste malča. Ustanovili su da je najučinkovitiji bio metil, zatim alil pa fenil izotiocijanat, što nije neobično s obzirom na poznatu visoku razinu fitotoksičnosti metil izotiocijanata. Isto tako su ustanovili da veće koncentracije izotiocijanata učinkovitije reducirale nicanje korova. Navedeni podaci ukazuju da bi se u narednim istraživanjima trebalo povećati koncentraciju fenil izotiocijanata s ciljem izrade krivulje osjetljivosti ambrozije odnosno one koncentracije fenil ITC-a koja će za 50 i 90% inhibirati klijanje i početni rast ambrozije. To nije bilo moguće s korištenim koncentracijama fenil ITC-a s obzirom da nisu utvrđene razlike u redukciji mjerenih parametara ambrozije između istraživanih koncentracija. Nasuprot tome, rezultati ovog istraživanja donose podatke o efektivnim dozama metil ITC-a potrebnim za redukciju radikule i iznose $3.8 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,5$ za 50%tnu redukciju (ED_{50}) odnosno $6,7 \text{ mg L}^{-1} \pm 2,3$ za 90%tnu redukciju (ED_{90}). Gotovo identične rezultate prikazuju Peterson i sur. (2001) gdje je također $3,8 \text{ mg L}^{-1}$ metil ITC-a za 50% reducirao klijavost korovne vrste *A. hybridus* L., duplo manja koncentracija u odnosu na feniletil ICT ($\text{ED}_{50} = 7,3 \text{ mg L}^{-1}$), a čak 20 puta manje u odnosu na *n*-butil ITC ($\text{ED}_{50} = 78,14 \text{ mg L}^{-1}$). Sjeme ambrozije krupnije je od sjemena *A. hybridus* što bi po većini autora sugeriralo i manju osjetljivost prema alelokemikalijama (Šćepanović i sur., 2021., Batish i sur., 2009., Reigosa, 1999.), što nije bio slučaj kod primjene metil ITC-a. Rezultati ovog istraživanja na ambroziji stoga potvrđuju prijašnje navode da je metil ITC jedan od najreaktivnijih izotiocijanata, iako je utvrđeno da svi izotiocijanatni spojevi imaju isti mehanizam djelovanja inhibirajući enzim odgovoran za glikolizu i disanje (Peterson i sur., 2001).

Rezultati istraživanja jasno ukazuju na *in vitro* potencijal metil ITC-a prema ambroziji. To sugerira da bi se na poljoprivrednim površinama na kojima se prije sjetve/sadnje koristi biofumigacija sa pripravcima koji se u tlu razgrađuju na metil ITC (pr. Basamid granulat), mogao očekivati i učinak na ambroziju. Ipak, izotiocijanati, a posebice metil ITC izrazito su hlapivi spojevi i slabo topivi u vodi što može otežati njihovu aplikabilnost kao folijarnog bioherbicida. Dodatno, kod pripreme vodenih otopina metil ITC može uzrokovati suzenje i iritaciju očiju, kože i nosa što predstavlja dodatan limit.

Za razliku od izotiocijanata, **fenolne kiseline** topive su u vodi, lako se ekstrahiraju iz biljnih tkiva što je vjerojatno razlog značajno većeg broja *in vitro* i *in vivo* istraživanja u odnosu na izotiocijanate. Osjetljivost ambrozije prema fenolnim kiselinama samo je istraživana u domaćoj literaturi (Pismarović i sur., 2024., Šćepanović i sur., 2021., Šćepanović

i sur., 2022.). Autori su istaknuli tri fenolne kiseline (vanilinska, *p*-kumarinska i ferulinska) koje u *in vitro* uvjetima inhibiraju kljanje i početni rast ambrozije. Stoga je cilj ovog rada bio utvrditi inhibitorni potencijal *p*-hidroksibenzojeve i klorogenske kiseline prema ambroziji. S obzirom da inhibitorni učinak fenolnih kiselina značajno ovisi o primjenim dozama (Šćepanović i sur., 2022., Reigosa i sur., 1999.) u istraživanju je korišteno sedam doza svake fenolne kiseline: 25, 50, 100, 200, 400, 600 i 800×10^{-7} mola. Rezultati istraživanja ukazuju da između ove dvije fenolne kiseline nije utvrđena značajna razlika u svim mjerenim parametrima kljanja i početnog rasta ambrozije (Tablica 2). Tako je prosječno radikula ambrozije bila reducirana za 43% primjenom klorogenske kiseline odnosno 40% primjenom *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Međutim, između primijenjenih doza utvrđena je značajna razlika u inhibiciji mjerenih parametara (Graf 4). Slično kao i u većini drugih istraživanja, i ovo *in vitro* istraživanje pokazuje da primjena fenolnih kiselina samo u većim dozama može ostvariti zadovoljavajući učinak prema ambroziji. Primjenom doza klorogenske i *p*-hikroksibenzojeve $\geq 200 \times 10^{-7}$ utvrđene su redukcije radikule od 43% do 84% i značajno su jače reducirale radikulu u odnosu na niže primijenjene doze (25, 50 i 100×10^{-7}). Uspoređujući iste doze ovih kiselina (klorogenska i *p*-hidroksibenzojeva) s vanilinskom, *p*-kumarinskom i ferulinskom kiselinom (Pismarović i sur., 2024.) može se zaključiti da obje kiseline imaju jači učinak prema ambroziji. Tako je primjena 600×10^{-7} *p*-klorogenske kiseline reducirala za 77% radikulu ambrozije, dok je primjerice vanilinska u istoj dozi reducirala za 57%. S druge strane *p*-kumarinska kiselina je u istraživanju Pismarović i sur. (2024) u dozi od 200×10^{-7} za 69% reducirala radikulu ambrozije, dok su u ovom istraživanju obje kiseline u toj dozi ostvarile redukciju oko 45%.

I rezultati ovog istraživanja ukazuju da je fenolne kiseline potrebno koristiti u višim dozama kako bi se ostvario učinak na ambroziju. Kod *in vivo* uvjeta vrlo će vjerojatno biti potrebno povećati doze što sugeriraju i Anwar i sur. (2023). U njihovom istraživanju u *in vivo* uvjetima ferulinska i galska kiselina primijenjene su u većim dozama nego u *in vitro* istraživanju. Pismarović i sur. (2024.) su ferulinsku, vanilinsku i *p*-kumarinsku kiselinu testirali i u *in vivo* uvjetima, ali za razliku od *in vitro* eksperimenta, nisu utvrdili značajne razlike u multispektralnim i svojstvima klorofilne fluorescencije ambrozije između fenolima tretiranim biljaka i netretiranim biljkama.

Za obje istraživane kiseline u ovom *in vitro* istraživanju procijenjene su doze koje za 50 i 90% (ED_{50} ED_{90}) inhibiraju duljinu radikule ambrozije. Tako je za klorogensku kiselinu ED_{50} iznosi 172×10^{-7} mol ± 0.5 , a za *p*-hirdoksibenzojevu 320×10^{-7} mol ± 85 . Uspoređujući s dozom (ED_{50}) ferulinske kiseline (368×10^{-7}) iz prethodnog istraživanja

(Šćepanović i sur., 2022.) vidljiv je potencijal ove dvije fenolne kiseline, a posebice klorogenske kiseline. Dodatno, obje kiseline su topive u vodi i pri najvišim dozama, a što nije slučaj s *p*-kumarinskom i ferulinskrom kiselinom (Pismarović i sur., 2024.) koje je za veće doze potrebno topiti s metanolom (Anwar i sur. , 2023).

Uspoređujući fenolne kiseline i izotiocijanate korištene u ovom istraživanju, vidljiv je potencijal obje skupine alelokemikalija na ambroziju, a posebice metil ITC-a i klorogenske kiseline. Istraživanja s ovim spojevima potrebno je nastaviti i u *in vivo* uvjetima koristeći veće koncentracije izotiocijanata odnosno veće doze fenolnih kiselina (Anwar i sur. , 2023). U slučaju potencijalnog kombiniranja ovih alelokemikalija s reduciranim dozama herbicida (Šćepanović i sur., 2022., Sarić-Krsmanović, 2020.) ovo istraživanje donosi efektivne doze (ED₅₀) koje mogu biti polazišna točka za kombiniranje ovih spojeva s reduciranim dozama herbicida.

6. Zaključci

Nakon provedenog *in vitro* istraživanja o utjecaju primjene različitih koncentracija izotiocianata -ITC (metil i feil) i fenolnih kiselina (klorogenska i *p*-hidroksibenzojeva) na klijanje i početni rast ambrozije može se zaključiti slijedeće:

- Klijavost, duljina radikule i hipokotila ambrozije bila je značajno reducirana primjenom metil ITC, ali je inhibirajući učinak ovisio o primijenjenim koncentracijama. Pri 80 i 160 mg L⁻¹ metil ITC klijavost je bila reducirana za 68 i 93%, a hipokotil za 83 i 100%. Duljina radikule je slabije inhibirana samo pri najnižim koncentracijama (2,5 i 5 mg L⁻¹) dok je pri koncentracijama od 10 do 160 mg L⁻¹ redukcija radikule iznosila od 51 do 98%.
- Primjena fenil ITC u koncentracijama ≥ 20 mg L⁻¹ značajno je bolje reducirala duljinu radikule (53-60%) u odnosu na niže koncentracije (7-18%). Klijavost i duljina radikule ambrozije značajno je slabije reducirana u usporedbi s metil ITC-om, pri koncentracijama 80 i 160 mg L⁻¹.
- Efektivna koncentracija (EC₅₀) metil ITC-a potrebna za 50% redukciju radikule ambrozije iznosi $3.8 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0.5$.
- Klorogenska i *p*-hidroksibenzojeva kiseline nisu se značajno razlikovale u inhibiciji klijanja, duljine radikule i duljine hipokotila ambrozije. Prosječno je radikula ambrozije bila reducirana za 43% primjenom klorogenske kiseline i 39,6 % primjenom *p*-hidroksibenzojeve, a hipokotil za 23% kod klorogenske i 20% kod *p*-hidroksibenzojeve kiseline.
- Utvrđena je značajna razlika u duljini radikule i hipokotila ambrozije između primijenjenih doza fenolnih kiselina ($25 - 800 \times 10^{-7}$ mol). Primjenom doze $\geq 200 \times 10^{-7}$ mol klorogenske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline utvrđena je značajno bolja redukcija radikule ambrozije u odnosu na niže doze. Hipokotil je bio značajno jače reduciran samo primjenom najviše doze fenolnih kiselina (800×10^{-7} mol) s 56% redukcije, a radikula pri dozama $\geq 200 \times 10^{-7}$ mol s 43-84% redukcije.
- Efektivna doze (ED₅₀) fenolnih kiselina potrebnih za 50% redukciju radikule ambrozije za $171,5 \times 10^{-7}$ mol $\pm 29,9$ za klorogensku kiselinu i $182,71 \times 10^{-7}$ mol $\pm 19,7$ za *p*-hidroksibenzojevu kiselinu.

7. Zahvale

Ovim putem se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Maji Šćepanović na prilici da sudjelujem u ovom i ostalim istraživanjima. Isto tako veliko hvala na svoj pomoći, poticajima, strpljenju, a ponajviše na vodstvu tokom izrade rada.

Isto tako veliko hvala. Lauri Pismarović, mag. agr na pomoći jer je bila uz mene u svakom koraku laboratorijskog dijela istraživanja. Hvala i za svu moralnu podršku i savjete.

Hvala i dr. sc. Valentini Šoštarčić na stručnim savjetima u istraživanju te pomoći pri postavljanju pokusa.

Želim se zahvaliti i ostalim djelatnicima Zavoda za herbologiju na pomoći i pruženoj podršci. Hvala i za mogućnost korištenja laboratorija tokom postavljanja pokusa. Hvala i svim praktikantima koji su pomogli oko postavljanja pokusa.

Nadalje, želim zahvaliti kolegicama univ. bacc. ing. agr. Emi Bubalo, Eni Mioč i Lei Modrić na odvojenom vremenu i pomoći u očitavanju rezultata pokusa.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na podršci, svakom savjetu i pomoći u trenutcima kada je bila najviše potrebna, ne samo pri izradi ovog rada već i tijekom cijelog studiranja.

Petra Gregurić

8. Popis literature

1. Alemu, D., Lemessa, F., Wakjira, M., Berecha, G. (2014). Inhibitory effects of some invasive alien species leaf extracts against tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(11), 1349-1364.
2. Almaghrabi, O. A. (2012). Control of wild oat (*Avena fatua*) using some phenolic compounds I—Germination and some growth parameters. Saudi journal of biological sciences, 19(1), 17-24.
3. Al-Turki, A. I., Dick, W. A. (2003). Myrosinase activity in soil. Soil Science Society of America Journal, 67(1), 139-145.
4. Anwar, S., Naseem, S., Ali, Z. (2023). Biochemical analysis, photosynthetic gene (psbA) down-regulation, and in silico receptor prediction in weeds in response to exogenous application of phenolic acids and their analogs. Plos one, 18(3), e0277146.
5. Bangarwa, S. K., Norsworthy, J. K. (2016). Effect of phenyl, allyl, and methyl isothiocyanate on *Cyperus rotundus* tubers under LDPE and VIF mulch. Crop Protection, 84, 121-124.
6. Bärberi, P. (2002). Weed management in organic agriculture: are we addressing the right issues?. Weed research, 42(3), 177-193.
7. Batish, D. R., Kaur, S., Singh, H. P., Kohli, R. K. (2009). Role of root-mediated interactions in phytotoxic interference of *Ageratum conyzoides* with rice (*Oryza sativa*). Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 204(5), 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.05.003>
8. Blažević, I., Montaut, S., Burçul, F., Olsen, C. E., Burow, M., Rollin, P., Agerbirk, N. (2020). Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. Phytochemistry, 169, 112100.
9. Bonanomi, G., Sicurezza, M. G., Caporaso, S., Esposito, A., Mazzoleni, S. (2006). Phytotoxicity dynamics of decaying plant materials. New Phytologist, 169(3), 571-578.
10. Borek, V., Morra, M. J., Brown, P. D., McCaffrey, J. P. (1995). Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitrile in soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(7), 1935-1940.

11. Brijačak E., Košćak L., Šoštarčić V., Kljak K., Šćepanović M. (2020). Sensitivity of yellow foxtail (*Setaria glauca* L.) and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.) to aqueous extracts or dry biomass of cover crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15): 5510-5517.
12. Brown, P. D., Morra, M. J. (1997). Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Advances in Agronomy*. Doi. 10.1016/S0065-2113(08)60664-1
13. Brown, P. D., Morra, M. J. (1995). Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 43(12), 3070-3074.
14. Büchi, L., Wendling, M., Amossé, C., Necpalova, M., Charles, R. (2018). Importance of cover crops in alleviating negative effects of reduced soil tillage and promoting soil fertility in a winter wheat cropping system. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 256, 92-104.
15. Chen, W., Dong, Y., Saqib, H. S. A., Vasseur, L., Zhou, W., Zheng, L., .You, M. (2020). Functions of duplicated glucosinolate sulfatases in the development and host adaptation of *Plutella xylostella*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 119, 103316.
16. Chew, F. S. (1988). Biological effects of glucosinolates. In *Biologically Active Natural Products: Potential Use in Agriculture*; Cutler, H. G., Ed.; ACS Symposium Series 380; American Chemical Society: Washington, DC, pp 155-181
17. Coppering, L. G., Hewitt, H. G. (1998). Chemistry and mode of action of crop protection agents. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847550422>
18. Czerniawski, P., Piasecka, A., Bednarek, P. (2021). Evolutionary changes in the glucosinolate biosynthetic capacity in species representing *Capsella*, *Camelina* and *Neslia* genera. *Phytochemistry*, 181, 112571.
19. del Moral, R., Muller, C. H. (1970). The allelopathic effects of *Eucalyptus camaldulensis*. *American Midland Naturalist*, 254-282.
20. Essl F., Biró K., Brandes D., Broennimann O., Bullock J. M., Chapman D.S., Karrer G.(2015). Biological flora of the British Isles: *Ambrosia artemisiifolia*. *Journal of Ecology*.103: 1069-1098
21. Farkas, G. L., Kiraaly, Z. (1962). Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. *Journal of Phytopathology*, 44(2), 105-150.

22. Farooq, M., Jabran, K., Cheema, Z. A., Wahid, A., Siddique, K. H. (2011). The role of allelopathy in agricultural pest management. Pest Management Science, 67(5), 493–506. <https://doi.org/10.1002/PS.2091>
23. Fenwick, G. R., Heaney, R. K., Mullin, W. J., VanEtten, C. H. (1983). Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 18(2), 123-201.
24. Fu, L., Wang, M., Han, B., Tan, D., Sun, X., Zhang, J. (2016). Arabidopsis myrosinase genes AtTGG4 and AtTGG5 are root-tip specific and contribute to auxin biosynthesis and root-growth regulation. International Journal of Molecular Sciences, 17(6), 892.
25. Gardiner, J. B., Morra, M. J., Eberlein, C. V., Brown, P. D., Borek, V. (1999). Allelochemicals released in soil following incorporation of rapeseed (*Brassica napus*) green manures. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(9), 3837-3842.
26. Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. J. Med. Plants Res, 5(31), 6697-6703.
27. Gimsing, A. L. Kirkegaard, J. A. (2009). Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. Phytochemistry Reviews, 8, 299-310.
28. Gomaa, N. H., Hassan, M. O., Fahmy, G. M., González, L., Hammouda, O., Atteya, A. M. (2014). Allelopathic effects of *Sonchus oleraceus* L. on the germination and seedling growth of crop and weed species. Acta Botanica Brasilica, 28(3), 408–416. <https://doi.org/10.1590/0102-33062014ABB3433>
29. Guillemin, J. P., Chauvel, B. (2011). Effects of the seed weight and burial depth on the seed behavior of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). Weed biology and Management, 11(4), 217-223.
30. Hall, A. B., Blum, U., Fites, R. C. (1982). Stress modification of allelopathy of *Helianthus annuus* L. debris on seed germination. American Journal of Botany, 69(5), 776-783.
31. Hassan, M. M., Daffalla, H. M., Yagoub, S. O., Osman, M. G., Gani, M. E. A., Babiker, A. G. E. (2012). Allelopathic effects of some botanical extracts on germination and seedling growth of *Sorghum bicolor* L. Journal of Agricultural Technology, 8(4), 1423-1469.

32. Heidarzade, A., Pirdashti, H., Esmaeili, M. A., Asghari, J. (2012). Inhibitory activity of allelochemicals on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.) seed and seedling parameters. *World Appl. Sci. J.*, 17(11), 1535-1540.
33. Heap, I. (2024) The International Herbicide-Resistant Weed Database. Online. Thursday, August 29, 2024 . Available www.weedscience.org
34. Jabran, K., Mahajan, G., Sardana, V., Chauhan, B. S. (2015). Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop protection*, 72, 57-65.
35. Jones, D. A. (1971). Chemical defense mechanisms and genetic polymorphism. *Science*, 173(4000), 945-945.
36. Kabouw, P., van der Putten, W. H., van Dam, N. M., Biere, A. (2010). Effects of intraspecific variation in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) on soil organisms. *Plant and Soil*, 336, 509-518.
37. Kim, J. H., Lee, B. W., Schroeder, F. C., Jander, G. (2008). Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *Myzus persicae* (green peach aphid). *The Plant Journal*, 54(6), 1015-1026.
38. Kobayashi, K. (2004). Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed biology and management*, 4(1), 1-7.
39. Kunz, C., Sturm, D. J., Varnholt, D., Walker, F., Gerhards, R. (2016). Allelopathic effects and weed suppressive ability of cover crops.
40. Liebman. (2000). Integration of soil, crop and weed management in low-external-input farming systems. *Weed research*, 40(1), 27-47.
41. Li, Z. H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C. D., Jiang, D. A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15(12), 8933-8952.
42. Mandal, S. M., Chakraborty, D., Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling & behavior*, 5(4), 359-368.
43. Manuja, R., Sachdeva, S., Jain, A., Chaudhary, J. (2013). A comprehensive review on biological activities of p-hydroxy benzoic acid and its derivatives. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 22(2), 109-115.
44. Martínez-Ballesta, M., Moreno-Fernández, D. A., Castejón, D., Ochando, C., Morandini, P. A., Carvajal, M. (2015). The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on water transport under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 6, 524.
45. Müller, C. (2009). Role of glucosinolates in plant invasiveness. *Phytochemistry Reviews*, 8, 227-242.

46. Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 97, 67-74.
47. Ostojić, Zvonimir Korovi // Hrvatska enciklopedija. 2004.
48. Perotti, V. E., Larran, A. S., Palmieri, V. E., Martinatto, A. K., Permingeat, H. R. (2020). Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. *Plant Science*, 290, 110255.
49. Petersen, J., Belz, R., Walker, F. Hurle, K. (2001). Weed suppression by release of isothiocyanates from turnip-rape mulch. *Agronomy Journal*, 93(1), 37-43.
50. Pismarović, L. (2024). Three inhibitory phenolic acids against common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) had a minimal effect on maize growth in vitro and in vivo. *Plos One*. Prihvaćeno za objavu
51. Podolska, G., Gujska, E., Klepacka, J., Aleksandrowicz, E. (2021). Bioactive Compounds in Different Buckwheat Species. *Plants*, 10(961), 1–13.
52. Potter, M. J., Vanstone, V. A., Davies, K. A., Kirkegaard, J. A., Rathjen, A. J. (1999). Reduced susceptibility of *Brassica napus* to *Pratylenchus neglectus* in plants with elevated root levels of 2-phenylethyl glucosinolate. *Journal of Nematology*, 31(3), 291.
53. Radosevich, S. R., Holt, J. S. Ghersa, C. (1997). Weed ecology: implications for management. John Wiley & Sons.
54. Rakariyatham, N., Butrindr, B., Niamsup, H.,Shank, L. (2005). Screening of filamentous fungi for production of myrosinase. *Brazilian journal of microbiology*, 36, 242-245.
55. Reigosa, M. J., Souto, X. C., González, L. (1999). Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regulation*, 28, 83-88.
56. Sakorn, P., Rakariyatham, N., Niamsup, H., & Nongkunsarn, P. (2002). Rapid detection of myrosinase-producing fungi: a plate method based on opaque barium sulphate formation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 73-74.
57. Sarić- Krsmanović M., Radivojević LJ., Šantrić LR., Đorđević TM., Gajić Umiljendić J. (2020). Učinci mješavina vodenih ekstrakata alelopatskih biljaka i herbicida na suzbijanje korova. *J. Okolina. Sci. Zdravlje—B Pestic . Hrana Contam . Agric. Otpad .* 56 (1), 16–22.

58. Sarwar, M., Kirkegaard, J. A., Wong, P. T. W., Desmarchelier, J. (1998). Biofumigation potential of brassicas. *Plant and Soil*, 201, 103-112.
59. Scavo, A., Mauromicale, G. (2020). Integrated weed management in herbaceous field crops. *Agronomy*, 10(4), 466.
60. Stupnicka-Rodzynkiewicz, E., Dabkowska, T., Stoklosa, A., Hura, T., Dubert, F., Lepiarczyk, A. (2006). The effect of selected phenolic compounds on the initial growth of four weed species. *Zeitschrift fur pflanzenkrankheiten und pflanzenschutzsonderheft-*, 20, 479.
61. Šarić, T., Ostojić, Z., Stefanović, L., Milanova, S. D., Kazinczi, G., Tyšer, L. (2011). The changes of the composition of weed flora in Southeastern and Central Europe as affected by cropping practices. *Herbologia*, 12(1).
62. Šćepanović, M., Sarić-Krsmanović, M., Šoštarčić, V., Brijačak, E., Lakić, J., Špirović Trifunović, B., Radivojević, L. (2021). Inhibitory effects of brassicaceae cover crop on *Ambrosia artemisiifolia* germination and early growth. *Plants*, 10(4), 794.
63. Šćepanović, M., Košćak, L., Šoštarčić, V., Pismarović, L., Milanović-Litre, A. Kljak, K. (2022). Selected phenolic acids inhibit the initial growth of *Ambrosia artemisiifolia*. *L. Biology*, 11(4), 482.
64. Šćepanović M., Šoštarčić V., Pintar A., Lakić J., Klara B. (2020). Pojava rezistentnih populacija korova na herbicide inhibitore acetolaktat-sintaze u Republici Hrvatskoj. *Glasilo biljne zaštite*, 20(6): 628-640
65. Teasdale, J. R., Taylorson, R. B. (1986). Weed seed response to methyl isothiocyanate and metham. *Weed Science*, 34(4), 520-524.
66. Tesio, F., Ferrero, A. (2010). Allelopathy, a chance for sustainable weed management. *International Journal of Sustainable Development & World Ecology*, 17(5), 377-389.
67. Kefeli, V. I., Kalevitch, M. V., Borsari, B. (2003). Phenolic cycle in plants and environment. *J. Cell Mol. Biol*, 2(1), 13-18.
68. Zhao, Z., Zhang, W., Stanley, B. A., Assmann, S. M. (2008). Functional proteomics of *Arabidopsis thaliana* guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. *The Plant Cell*, 20(12), 3210-3226.

Sažetak

Petra Gregurić

Učinak izotiocijanata i fenolnih kiselina na *in vitro* klijanje i početni rast korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L.

Izotiocijanati i fenolne kiseline sekundarni su metaboliti biljaka posebice iz porodice Brassicaceae. Posjeduju inhibirajući učinak prema korovima i time predstavljaju potencijalni alternativni oblik suzbijanja korovnih vrsta. Cilj ovog *in vitro* istraživanja bio je utvrditi učinak sedam koncentracija ($2,5, 5, 10, 20, 40, 80$ i 160 mg L^{-1}) izotiocijanata – ITC (metil i fenil) i sedam doza ($25, 50, 100, 200, 400, 600$ i $800 \times 10^{-7} \text{ mol}$) fenolnih kiselina (klorogenska i *p*-hidroksibenzojeva) na klijanje te početni rast i razvoj korovne vrste *Ambrosia artemisiifolia* (ambrozija). Rezultati *in vitro* istraživanja potvrđuju postavljenje hipoteze da će fenolne kiseline i izotiocijanati iskazati inhibirajući učinak prema ambroziji, ali da će se inhibicija značajno razlikovati u ovisnosti o dozi primjenjenog spoja. Metil ITC u najvišim koncentracijama (80 i 160 mg L^{-1}) značajno je jače inhibirao klijavost (68% i 93%) i duljinu hipokotila (91% i 100%) u odnosu na ostale koncentracije metil i fenil ITC-a. Duljina radikule ambrozije inhibirana je od 42% do 98% primjenom koncentracija metil izotiocijanata od $5 - 160 \text{ mg L}^{-1}$. Primjenom fenil ITC-a u koncentracijama $20, 40, 80$ i 160 mg L^{-1} radikula je reducirana od 42% do 61%, a pri koncentracijama $\leq 10 \text{ mg L}^{-1}$ radikula je značajno slabije reducirana (<18%). Između klorogenske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline nije bilo značajnih razlika u inhibiciji klijanja i početnog rasta ambrozije. Primjenom klorogenske kiseline, radikula ambrozije bila je smanjena u prosjeku za 43%, a kod *p*-hidroksibenzojeve kiseline za 39,6%. Primjenom doze $\geq 200 \times 10^{-7} \text{ mol}$ klorogenske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline utvrđena je značajno bolja redukcija radikule ambrozije u odnosu na niže doze dok je hipokotil bio značajno jače reducirano samo primjenom najviše doze fenolnih kiselina ($800 \times 10^{-7} \text{ mol}$) s 56% redukcije. Procijenjena koncentracija metil ITC-a potrebna da za 50% reducira radikulu ambrozije EC₅₀ iznosi $3,8 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0,5$, a ED₅₀ za fenolne kiseline iznosi: $171,5 \times 10^{-7} \text{ mol} \pm 29,9$ za klorogensku i $182,71 \times 10^{-7} \text{ mol} \pm 19,7$ za *p*-hidroksibenzojevu kiselinu. Rezultati istraživanja ukazuju na inhibitorni potencijal metil ITC-a i klorogenske kiseline, a istraživanja s ovim spojevima potrebno je nastaviti i u *in vivo* uvjetima.

Ključne riječi: metil izotiocijanat, fenil izotiocijanat, klorogenska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, ambrozija

Summary

Petra Gregurić

The effect of isothiocyanates and phenolic acids on *in vitro* germination and initial growth of the weed species *Ambrosia artemisiifolia* L.

Isothiocyanates and phenolic acids are secondary plant metabolites, particularly from the Brassicaceae family. They have an inhibitory effect on weeds and thus represent a possible alternative form of weed control. The aim of this *in vitro* study was to analyze the effect of seven concentrations (2.5, 5, 10, 20, 40, 80, and 160 mg L⁻¹) of isothiocyanates—ITC (methyl and phenyl)—and seven doses (25, 50, 100, 200, 400, 600, and 800 x 10⁻⁷ mol) of phenolic acids (chlorogenic and *p*-hydroxybenzoic acid) on the germination, initial growth, and development of the weed species *Ambrosia artemisiifolia* (ragweed). The results of the *in vitro* study confirm the hypothesis that phenolic acids and isothiocyanates have an inhibitory effect on ragweed, but that inhibition varies significantly depending on the dose of the compound applied. Methyl ITC at the highest concentrations (80 and 160 mg L⁻¹) significantly inhibited germination (68% and 93%) and hypocotyl length (91% and 100%) compared to other concentrations of methyl and phenyl ITC. The length of ragweed radicles was inhibited by 42% to 98% by application of methyl ITC concentrations ranging from 5 to 160 mg L⁻¹. Application of phenyl ITC at concentrations of 20, 40, 80, and 160 mg L⁻¹ reduced radicle length by 42% to 61%, while at concentrations ≤10 mg L⁻¹, radicle reduction was significantly lower (<18%). There were no significant differences between chlorogenic and *p*-hydroxybenzoic acid in inhibiting the germination and initial growth of ragweed. The application of chlorogenic acid reduced the average length of ragweed radicles by 43%, and *p*-hydroxybenzoic acid by 39.6%. When doses ≥ 200 x 10⁻⁷ mol of chlorogenic and *p*-hydroxybenzoic acid were applied, a significantly better reduction in ragweed radicle length was observed compared to lower doses, while the hypocotyl was significantly more reduced only with the highest dose of phenolic acids (800 x 10⁻⁷ mol), with a reduction of 56%. The estimated concentration of methyl ITC required to reduce ragweed radicle length by 50% (EC50) is 3.8 mg mL⁻¹ ± 0.5, and the ED50 for phenolic acids is 171.5 x 10⁻⁷ mol ± 29.9 for chlorogenic acid and 182.71 x 10⁻⁷ mol ± 19.7 for *p*-hydroxybenzoic acid. The research results indicate the inhibitory potential of methyl ITC and chlorogenic acid, and further studies with these compounds under *in vivo* conditions are required.

Key words: methyl isothiocyanate, phenyl isothiocyanate, chlorogenic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, ragweed

Životopis

Petra Gregurić rođena je 4. 2. 2002. u Novoj Gradiški. Pohađala je osnovnu školu „Vladimir Nazor“ u Adžamovcima gdje je sudjelovala u natjecanjima iz biologije, geografije i vjeroučenja te plesnim revijama na kojima je nastupala s plesnom skupinom kao dio izvannastavne aktivnosti. Od 2016. do 2020. školuje se u općoj gimnaziji u Novoj Gradiški. Godine 2020. upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Fitomedicina. Počevši od 2021. godine, naredne tri godine zapošljava se kao sezonski radnik u firmi Eurofins Croatiakontrola d.o.o. u produžnici u Novoj Gradiški, gdje u laboratoriju firme Slavonija Slad d.o.o. radi na analizi pivarskog ječma za proizvodnju slada. Godine 2023. upisuje diplomski studij Fitomedicine i 2024. godine sudjeluje na 66. Seminaru biljne zaštite u Opatiji gdje osvaja nagradu za najbolji studentski poster na temu „Selektivni učinak kombinacije vanilične kiseline i reducirane doze mezotriona prema kukuruzu“ što je bila tema njezinog završnog rada. Od stranih jezika odlično se služi engleskim, poznaje osnove njemačkog jezika, a tijekom srednjoškolskog obrazovanja jednu godinu učila je francuski i grčki jezik.