

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet

Dorian Dragičević, Matea Eršetić i Marina Horvat

**MOGUĆNOST PRIMJENE NATRIJEVA KLORIDA,  
SAHAROZE I SALICILNE KISELINE ZA POBOLJŠANJE  
FITOKEMIJSKOG SASTAVA I ANTIOKSIDACIJSKOG  
KAPACITETA KLICA ROTKVICE (*Raphanus sativus* L.) TE  
NJIHOVE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE ENZIMA  $\alpha$ -  
GLUKOZIDAZE**

Zagreb, 2020.

Ovaj je rad izrađen na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Šola i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

## POPIS KRATICA

A – apsorbancija (pri odgovarajućoj valnoj duljini)

AK – akarboza

ANOVA – eng. *Analysis of Variance*, analiza varijance

AUC – eng. *Area Under the Curve*, površina ispod krivulje

Benz – benzojeva kiselina

BSA – eng. *bovine serum albumine*, goveđi albumin serum

DF – eng. *dilution factor*, faktor razrjeđenja

DNMRT – eng. *Duncan's New Multiple Range Test*, Duncanov test višestrukih usporedbi

EBSA – ekvivalent goveđeg albumin seruma

EC3G – ekvivalent cijanidin-3-glukozida

EGK – ekvivalent galne kiseline

EK – ekvivalent katehina

ES – ekvivalent saharoze

ESIN – ekvivalent sinigrina

ET – ekvivalent Troloxa

$f_0$  – fluorescencija na početku

$f_n$  – fluorescencija u  $n$  sekundi

FC – Folin Ciocalteu (reagens)

Fer – ferulična kiselina

FRAP – eng. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*, sposobnost antioksidansa za redukciju  $Fe^{3+}$

Glukozidaza =  $\alpha$ -glukozidaza

Glukozin, TIG – eng. *total intact glucosinolates*, ukupni intaktni glukozinolati

h – hidrolizirani uzorci

HPLC – eng. *High-Performance Liquid Chromatography*, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ISR – eng. *induced systemic resistance*, inducirana sustavna otpornost

JA – eng. *jasmonic acid*, jasmonska kiselina

K – kontrolna skupina biljaka

K-gluk – kempferol-glukozid

K-rut – kempferol-rutinozid

Kar – karotenoidi

Kav – kavena kiselina  
Klo – klorofili  
Klorog – klorogenska kiselina  
L-askorb – L-askorbinska kiselina  
n – nehidrolizirani uzorci  
ORAC – eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, kapacitet apsorpcije kisikovih radikala  
PANC, TPA – eng. *total proanthocyanidins*, ukupni proantocijanidini  
Q – kvercetin  
Q-digluk – kvercetin-3,4-diglukozid  
Q-gluk – kvercetin-glukozid  
Q-rut – kvercetin-rutinozid  
RNS – eng. *reactive nitrogen species*, reaktivne dušikove vrste  
ROS – eng. *reactive oxygen species*, reaktivne kisikove vrste  
SA – eng. *salicylic acid*, salicilna kiselina  
Sah – saharoza  
SAR – eng. *systemic acquired resistance*, sustavno stečena otpornost  
Sin – sinapinska kiselina  
SM – suha masa  
TA – eng. *total anthocyanins*, ukupni antocijani  
TF – eng. *total flavonoids*, ukupni flavonoidi  
TP – eng. *total phenolics*, ukupni fenoli  
TPA – eng. *total proanthocyanidins*, ukupni proantocijanidini  
TPR – eng. *total proteins*, ukupni proteini  
TSS – eng. *total soluble sugars*, ukupni topivi šećeri  
TT – eng. *total tannins*, ukupni tanini

# SADRŽAJ RADA

## 1. UVOD

1.1. Značaj bioaktivnih spojeva kupusnjača (Brassicaceae) za ljudsko zdravlje	1
1.2. Prehrambeni potencijal rotkvice ( <i>Raphanus sativus</i> L.)	2
1.3. Upotreba biljnih klica u ljudskoj prehrani	4
1.4. Definicija i podjela elicitora	6
1.5. Način djelovanja elicitora	8
1.6. Učinak elicitora na fitokemijski profil biljaka	11
1.7. Učinak elicitora na antioksidacijski kapacitet biljaka	13
1.8. Učinak elicitora na aktivnost enzima $\alpha$ -glukozidaza	14
1.9. Opći i specifični ciljevi rada	16

## 2. MATERIJAL I METODE

2.1. Uzgoj klica i tretman elicitorima	19
2.2. Mjerenje ukupnih fenola	20
2.3. Mjerenje ukupnih flavonoida	20
2.4. Mjerenje ukupnih tanina	21
2.5. Mjerenje ukupnih proantocijanidina	21
2.6. Mjerenje ukupnih topivih šećera	22
2.7. Mjerenje ukupnih proteina	22
2.8. Mjerenje ukupnih intaktnih glukozinolata	23
2.9. Mjerenje ukupnih fotosintetskih pigmenata	23
2.10. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija individualnih fenolnih spojeva i vitamina C metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja	25
2.11. Test inhibicije enzima $\alpha$ -glukozidaze	27
2.12. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka metodom ABTS	28
2.13. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka metodom FRAP	28
2.14. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka metodom ORAC	29
2.15. Statistička analiza podataka	30

## 3. REZULTATI

3.1. Utjecaj elicitora na fenotip klica rotkvice	32
3.2. Utjecaj elicitora na fitokemijski sastav klica rotkvice	33
3.2.1. Utjecaj elicitora na udio ukupnih fenola u klicama rotkvice	33

3.2.2. Utjecaj elicitora na udio ukupnih flavonoida u klicama rotkvice	34
3.2.3. Utjecaj elicitora na udio ukupnih tanina u klicama rotkvice	35
3.2.4. Utjecaj elicitora na udio ukupnih proantocijanidina u klicama rotkvice	36
3.2.5. Utjecaj elicitora na udio ukupnih topivih šećera u klicama rotkvice	37
3.2.6. Utjecaj elicitora na udio ukupnih proteina u klicama rotkvice	38
3.2.7. Utjecaj elicitora na udio ukupnih intaktnih glukozinolata u klicama rotkvice	39
3.2.8. Utjecaj elicitora na udio fotosintetskih pigmenata u klicama rotkvice	40
3.2.9. Utjecaj elicitora na koncentraciju pojedinačnih fenolnih spojeva i <i>L</i> -askorbinske kiseline u klicama rotkvice	43
3.2.9.1. Utjecaj elicitora na koncentraciju kempferola u klicama rotkvice	43
3.2.9.2. Utjecaj elicitora na koncentraciju kempferol-glukozida u klicama rotkvice	44
3.2.9.3. Utjecaj elicitora na udio kempferol-rutinozida u klicama rotkvice	45
3.2.9.4. Utjecaj elicitora na koncentraciju kvercetina u klicama rotkvice	46
3.2.9.5. Utjecaj elicitora na udio kvercetin-3,4-diglukozida u klicama rotkvice	48
3.2.9.6. Utjecaj elicitora na udio kvercetin-glukozida u klicama rotkvice	50
3.2.9.7. Utjecaj elicitora na udio kvercetin-rutinozida u klicama rotkvice	51
3.2.10. Utjecaj elicitora na koncentraciju pojedinačnih fenolnih kiselina u klicama rotkvice	52
3.2.10.1. Utjecaj elicitora na udio benzojeve kiseline u klicama rotkvice	52
3.2.10.2. Utjecaj elicitora na udio ferulične kiseline u klicama rotkvice	54
3.2.10.3. Utjecaj elicitora na udio kavene kiseline u klicama rotkvice	55
3.2.10.4. Utjecaj elicitora na udio klorogenske kiseline u klicama rotkvice	57
3.2.10.5. Utjecaj elicitora na udio salicilne kiseline u klicama rotkvice	58
3.2.10.6. Utjecaj elicitora na udio sinapinske kiseline u klicama rotkvice	60
3.2.11. Utjecaj elicitora na koncentraciju <i>L</i> -askorbinske kiseline u klicama rotkvice	62
3.3. Utjecaj elicitora na potencijal klica rotkvice da inhibiraju enzim $\alpha$ -glukozidazu	64
3.4. Utjecaj elicitora na antioksidacijski kapacitet klica rotkvice	65
3.4.1. Utjecaj elicitora na antioksidacijski kapacitet klica rotkvice određen metodom ABTS	65
3.4.2. Utjecaj elicitora na antioksidacijski kapacitet klica rotkvice određen metodom FRAP	66
3.4.3. Utjecaj elicitora na antioksidacijski kapacitet klica rotkvice određen metodom ORAC	67
3.5. Kemometrijske analize	68
3.5.1. Analiza glavnih komponenata	68

3.5.2. Hijerarhijsko klasteriranje	70
3.5.3. Analiza Pearsonovih koeficijenata korelacije	71
<b>4. RASPRAVA</b>	
4.1. Utjecaj elicitora na fenotip klica rotkvice	74
4.2. Utjecaj elicitora na fitokemijski sastav klica rotkvice	75
4.2.1. Utjecaj elicitora na udio ukupnih fenola u klicama rotkvice	75
4.2.2. Utjecaj elicitora na udio ukupnih flavonoida u klicama rotkvice	77
4.2.3. Utjecaj elicitora na udio ukupnih tanina u klicama rotkvice	78
4.2.4. Utjecaj elicitora na udio ukupnih proantocijanidina u klicama rotkvice	79
4.2.5. Utjecaj elicitora na udio ukupnih topivih šećera u klicama rotkvice	80
4.2.6. Utjecaj elicitora na udio ukupnih proteina u klicama rotkvice	82
4.2.7. Utjecaj elicitora na udio ukupnih intaktnih glukozinolata u klicama rotkvice	82
4.2.8. Utjecaj elicitora na udio ukupnih fotosintetskih pigmenta u klicama rotkvice	84
4.2.9. Utjecaj elicitora na koncentraciju pojedinačnih fenolnih spojeva i L-askorbinske kiseline u klicama rotkvice	87
4.2.9.1. Utjecaj elicitora na koncentraciju kempferola i njegovih derivata u klicama rotkvice	87
4.2.9.2. Utjecaj elicitora na koncentraciju kvercetina i njegovih derivata u klicama rotkvice	88
4.2.10. Utjecaj elicitora na koncentraciju pojedinačnih fenolnih kiselina u klicama rotkvice	90
4.2.10.1. Utjecaj elicitora na udio benzojeve kiseline u klicama rotkvice	90
4.2.10.2. Utjecaj elicitora na udio ferulične kiseline u klicama rotkvice	91
4.2.10.3. Utjecaj elicitora na udio kavene kiseline u klicama rotkvice	92
4.2.10.4. Utjecaj elicitora na udio klorogenske kiseline u klicama rotkvice	92
4.2.10.5. Utjecaj elicitora na udio salicilne kiseline u klicama rotkvice	93
4.2.10.6. Utjecaj elicitora na udio sinapinske kiseline u klicama rotkvice	94
4.2.11. Utjecaj elicitora na koncentraciju L-askorbinske kiseline u klicama rotkvice	94
4.3. Utjecaj elicitora na potencijal klica rotkvice da inhibiraju enzim $\alpha$ -glukozidazu	96
4.4. Utjecaj elicitora na antioksidacijski kapacitet klica rotkvice	97
4.5. Analiza glavnih komponenata, hijerarhijsko klasteriranje i Pearsonovi koeficijenti korelacije	98
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	102
<b>6. ZAHVALE</b>	103
<b>7. LITERATURA</b>	104

**8. SAŽETAK**

120

**9. SUMMARY**

124



# 1. UVOD

## 1.1. Značaj bioaktivnih spojeva kupusnjača (*Brassicaceae*) za ljudsko zdravlje

Povrće iz porodice kupusnjača važan je dio prehrane ljudi i prosječno čini otprilike 10-15% ukupne količine povrća koje ljudi konzumiraju, a u nekim državama u kojima se intenzivno konzumira, udio ovog povrća dostiže čak i do 25% ukupne količine konzumiranog povrća (Barillari i sur., 2006). Kupusnjače sadrže velik udio bioaktivnih spojeva koji djeluju kao snažni antioksidansi (fenolni spojevi, glukozinolati, vitamini) te antioksidacijske enzime poput superoksid-dismutaze (Natella i sur., 2016). Brojna istraživanja ukazuju na važnost upotrebe kupusnjača u prehrani jer njihovi bioaktivni spojevi pokazuju antikancerogeni učinak (Liu i Lv, 2013), te povoljno djelovanje na kardiovaskularni sustav čovjeka (Cornelis i sur., 2007). Tijekom rasta i razvoja biljke, koncentracije ovih bioaktivnih spojeva mijenjaju se, isto kao što se mijenjaju i u ovisnosti o određenim okolišnim čimbenicima kojima je biljka izložena. Ti čimbenici mogu biti biotičke (npr. razni patogeni) i abiotičke (npr. visoke i niske temperature, poplava i suša, itd.) prirode, a biljka će im se prilagođavati specifičnim metaboličkim odgovorima, što ujedno rezultira postupnim i značajnim promjenama njihova metaboloma. Fluidnost metaboloma kupusnjača ovisno o uvjetima u okolišu već je dokumentirana (Jahangir i sur., 2009). Osim uvjeta u prirodnom okolišu, jedan od načina kako povećati koncentraciju ciljanih spojeva od interesa ili smanjiti koncentraciju nepoželjnih jest razvoj transgeničnih biljaka u laboratoriju, što se postiže prekomjernom ekspresijom ili inaktivacijom gena te kloniranjem regulatornih faktora (Velasco i sur., 2016). Ukoliko se želi pojačati sintezu nutritivnih komponenti poput glukozinolata i fenolnih spojeva u kupusnjača, moguće je primijeniti i bakteriju *Agrobacterium rhizogenes* koja će uzrokovati stvaranje transgeničnih kultura kosmatog korijenja (Chung i sur., 2016). Primjerice, povećana ekspresija gena uključenih u biosintezu

indolnih glukozinolata iz roda *Arabidopsis* (CYP79B2, CYP79B3 i CYP83B1) u kosmatom korijenu pekinškog kupusa postignuta je ovom metodom metaboličkog inženjerstva (Zang i sur., 2008). Uz to, povećan prinos bioaktivnih spojeva moguće je postići i biljnom staničnom kulturom u uvjetima *in vitro* (Raiola i sur., 2018).

## 1.2. Prehrambeni potencijal rotkvice (*Raphanus sativus* L.)

Između više od 350 rodova i 3000 vrsta porodice kupusnjača, rotkvice (*Raphanus sativus* L.) je jedna od najčešće konzumiranih vrsta, kako u zrelom stadiju, tako i u obliku klica (Barillari i sur., 2006). Rotkvice je jednogodišnja biljka koja se do odraslog stadija uzgaja zbog zadebljalog korijena i hipokotila koji se konzumiraju u brojnim kulturama, ali kultiviraju se i za proizvodnju ulja te zelenog gnojiva (Kaneko i Matsuzawa, 1993), a u posljednje se vrijeme sve češće konzumiraju njene klice (Manivannan i sur., 2019). Sjemenke većine vrsta roda *Raphanus* sadrže visok postotak eteričnih ulja, kalcija, željeza, magnezija, vitamina B6 i C, folne kiseline i riboflavina, te mali udio zasićenih masnih kiselina i kolesterola (Singh i Singh, 2013). Listovi su dobar izvor proteina, aminokiselina i enzima (Ibrahim i sur., 2016), te flavonoida kvercetina (Balasubramanian i sur., 2018). U usporedbi s korijenom, listovi posjeduju veću koncentraciju proteina, kalcija i vitamina C, koncentracija ukupnih fenola dvostruko je veća nego u korijenu, a koncentracija ukupnih flavonoida čak četiri puta veća u listovima nego korijenu (Goyeneche i sur., 2015). Ekstrakti gomolja i listova rotkvice koriste se za ublažavanje želučanih tegoba, konstipacije, urinarnih infekcija, upala jetre, srčanih poremećaja i čireva (Goyeneche i sur., 2015), a dokazana je i njihova učinkovitost u ublažavanju simptoma anksioznosti (Siddiq i sur., 2018). Vodeni ekstrakt gomolja rotkvice posjeduje hipoglikemijska svojstva zahvaljujući prisutnosti inzulinu-sličnih polifenola ili spojeva koji snižavaju koncentraciju glukoze u krvi bez

pojačanog izlučivanja inzulina (Broadhurst i sur., 2000; Taniguchi i sur., 2007). Antidijabetičko djelovanje ekstrakata rotkvice može se temeljiti na sljedećim mehanizmima: *a)* regulaciji hormona koji održavaju homeostazu glukoze, *b)* sprječavanju dijabetesom-induciranog oksidativnog stresa, te *c)* balansiranju unosa i apsorpcije glukoze (Banihani, 2017). Mehanizam antidijabetičkog djelovanja ekstrakata rotkvice još nije razjašnjen, no pretpostavlja se da se temelji na *a)* regulaciji hormona koji održavaju homeostazu glukoze, *b)* sprječavanju dijabetesom-induciranog oksidativnog stresa, te *c)* balansiranju unosa i apsorpcije glukoze (Banihani, 2017). Ekstrakti rotkvice pojačavaju i sintezu adiponektina, centralnog proteina uključenog u regulaciju metabolizma glukoze i lipida koje izlučuje masno tkivo (Okada i sur., 2010). Sok korijena rotkvice inhibirao je rast bakterija *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocyaneus*, *Salmonella typhi*, i *Bacillus subtilis in vitro* (Abdou i sur., 1972). Dokazano je da vodeni ekstrakti klica rotkvice inhibiraju enzime  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu u uvjetima *in vitro* (Baenas i sur., 2016; Rubilar i sur., 2011). Također, i vodeni ekstrakti listova rotkvice koncentracije 10 mg/mL značajno inhibiraju  $\alpha$ -glukozidaznu aktivnost (Kim i sur., 2014). Navedeni enzimi potrebni su za proces razgradnje polisaharida i oligosaharida u crijevima prije apsorpcije. Na taj način, navedena enzimatska inhibicija može reducirati količinu apsorbirane glukoze, što može biti uspješno iskorišteno za primjenu u prevenciji dijabetesa (Baenas i sur., 2016).

Takaya i sur. (2003) usporedili su antioksidacijsku aktivnost različitih vrsta povrća i ustanovili da klice rotkvice imaju najveću aktivnost. Ekstrahirali su i identificirali 12 glavnih bioaktivnih spojeva koji su pridonijeli antioksidacijskoj aktivnosti metanolnog ekstrakta klica rotkvice i među njima su najzastupljeniji bili esteri sinapinske kiseline. Iako je suma antioksidacijskih aktivnosti ovih pojedinačnih spojeva bila niža od antioksidacijske aktivnosti cijelog ekstrakta, ovi su spojevi sigurno doprinijeli ukupnom učinku ekstrakta.

Autori tog rada pretpostavljaju da su esteri sinapinske kiseline djelovali sinergistički s ostalim antioksidansima, prije svega flavonoidima. Barillari i sur. (2006) usporedili su sadržaj glukozinolata između klica i rotkvica u zreлом stadiju, te zabilježili da su klice bogatije ovim spojevima od zrelih biljaka. Dodatno su naglasili prednost klica zbog njihove konzumacije u sirovom stanju jer je tada bioraspoloživost bioaktivnih izotiocijanata još veća s obzirom da mirozinaze (enzimi koji cijepaju glukozinolate u biološki aktivne izotiocijanate) nisu inaktivirane visokim temperaturama kuhanja.



**Slika 1.** *Raphanus sativus* L. (rotkvica). Slika preuzeta sa stranice [https://www.gardensonline.com.au/gardenshed/plantfinder/show\\_2030.aspx](https://www.gardensonline.com.au/gardenshed/plantfinder/show_2030.aspx)

### 1.3. Upotreba biljnih klica u ljudskoj prehrani

Zbog sve veće težnje za zdravom hranom i onom koja ne zahtjeva puno vremena za pripremu, klice iz porodice kupusnjača sve su zastupljenije u ljudskoj prehrani. Lako se i brzo uzgajaju, a za rast su im potrebni samo svjetlost i voda. Nije ih potrebno termički obrađivati prije konzumacije, što bi moglo dovesti do gubitka bioaktivnih molekula.

Istraživanja pokazuju kako klice sadrže visoke koncentracije specijaliziranih metabolita poput glukozinolata i fenolnih spojeva, bioaktivnih spojeva biljaka koji doprinose ljudskom zdravlju, koji se u većim količinama mogu naći u klicama nego zreloj brokuli (Singh i sur., 2007; Pérez-Balibrea i sur., 2011). Sadržaj fenolnih spojeva u klicama kupusa, rotkvice i ostalih kupusnjača otprilike je deset puta veći nego u zreлом stadiju (Cevallos-Casals i Cisneros-Zevallos, 2010; Li i sur., 2018). Klice kineskog kupusa sadrže više sinapinske kiseline i vitamina C nego biljka s razvijenim pravim listovima (Šola i sur., 2020). Bijeli kupus starosti dva do tri mjeseca sadrži više fitokemikalija od odraslog stadija (Šamec i sur., 2011). Ukupni fenolni spojevi prisutni u klicama korabe, podzemne korabe, crvenog kupusa, repe i rotkvice smanjuju se tijekom prvih 12 dana razvoja (Baenas i sur., 2012). Također, ukupan sadržaj fenola kineske jagode niži je u kasnijim stadijima rasta i razvoja, dok se antioksidativna aktivnost navedene vrste i borovnica smanjuje sazrijevanjem (Castrejón i sur., 2008).

Klice rotkvice već su proučavane u kontekstu utjecaja na zdravlje čovjeka. Primijećeno je kako snižavaju razinu glukoze u krvi, povoljno utječu na mitohondrijske metaboličke procese i poboljšavaju metabolizam lipida, što bi se moglo primijeniti u liječenju dijabetesa tipa 2 (Taniguchi i sur., 2006; Baenas i sur., 2016). Također služe kao dobar izvor antioksidansa koji djeluju protiv štetnih slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva nastalih kao produkti metaboličkih reakcija (Park i sur., 2016). Zbog izrazitih nutritivnih vrijednosti i sve učestalije upotrebe rotkvice u prehrani, interes za mogućnošću modulacija njihovog fitokemijskog sastava temeljni je razlog odabira navedene vrste u ovome istraživanju.

## **1.4. Definicija i podjela elicitora**

Elicitori su kemijski spojevi abiotičkog ili biotičkog podrijetla te biljni hormoni koji mogu potaknuti stresne reakcije u biljkama, što dovodi do pojačane sinteze i nakupljanja već prisutnih specijaliziranih metabolita ili čak stvaranja novih tipova metabolita (Naik i Al-Khayri, 2016). U tablici 1 prikazana je podjela elicitora s obzirom na njihovo podrijetlo te su navedeni najpoznatiji primjeri.

**Tablica 1.** Podjela elicitora s obzirom na njihovo podrijetlo (preuzeto i prilagođeno prema radu Baenas i sur. (2014)).

<b>Biotički elicitori</b>	
Lipopolisaharidi	
Polisaharidi: pektin i celuloza (stanična stijenka), hitozan, hitin i glukani (mikroorganizmi), alginat, arapska guma, guar guma, guma rogačeve mahune, kvašćev ekstrakt	
Oligosaharidi: galakturonidi, guluronat, manan, manuronat	
Proteini: celulaza, kriptogein, glikoproteini, oligandrin, pektolijaza, hidrolizati ribljeg proteina, laktoferin	
Smjese složenih spojeva: spore gljive, stanična stijenka micelija, stanična stijenka mikroorganizama	
Patogeni toksini: koronatin	
Ekstrakt origana	
<b>Abiotički elicitori</b>	
<u>Kemijski</u>	<u>Fizikalni</u>
Octena kiselina	Promijenjeni sastav plinova
Benzotiadizol	Pothlađivanje
Silicij	CO <sub>2</sub>
Bioregulator proheksadion	Suša
Etanol	Ekstremni temperaturni šokovi
Eten	Visok tlak
Anorganske soli: HgCl <sub>2</sub> , CuSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , VSO <sub>4</sub>	Visoka ili niska osmolarnost
Ioni metala: Co <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Ag <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	UV zračenje
	Solni stres
	Ranjavanje
	Ozon
<b>Biljni hormoni</b>	
Jasmonska kiselina	
Metil-jasmonat	
Metil-salicilat	
Salicilna kiselina	
Etilen	
Citokinin	
Giberelin GA <sub>3</sub>	



Tip elicitora, koncentracija, raspored tretmana i vremenski period u kojemu će biti primijenjen glavni su faktori koji određuju učinak na proizvodnju specijaliziranih metabolita u nekoj biljnoj vrsti (Naik i Al-Khayri, 2016). Osim podjele s obzirom na podrijetlo, elicitore možemo podijeliti i s obzirom na način interakcije s biljkom na: *a*) „opće elicitore“ kao što su ugljikohidrati, proteini stanične stijenke, oligosaharidi, itd., koji induciraju nespecifične mehanizme za pokretanje obrambenog odgovora u biljnim staničnim kulturama, te *b*) „specifične elicitore“ bakterijskog, virusnog, biljnog fungalnog podrijetla koji utječu samo na specifične biljne kultivare jer je prisutnost odgovarajućeg gena otpornosti (rezistencije) u domaćinskoj biljci direktno povezana s otpornošću na specifični gen patogena (Baenas i sur., 2014). Poznato je da i primarni i specijalizirani metabolizam kupusnjača ovise o prisutnosti herbivora i patogena, hormona kao što su salicilna i jasmonska kiselina te etilen, temperaturi i svjetlosti, prisutnosti teških metala i fertilizatora u tlu (Jahangir i sur., 2009).

## 1.5. Način djelovanja elicitora

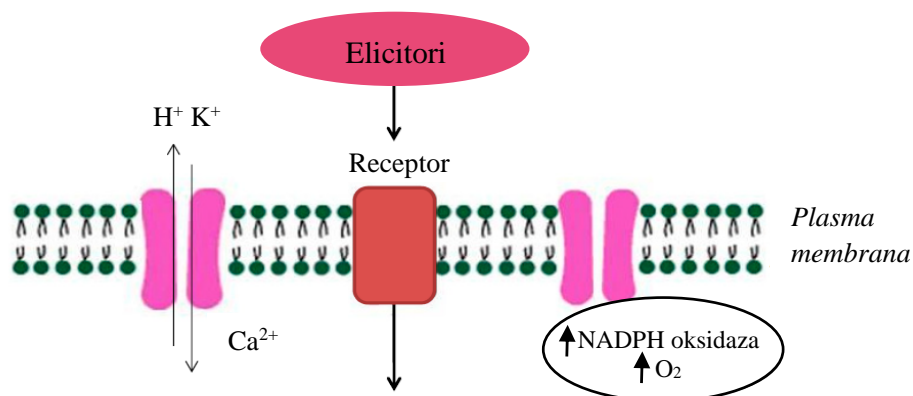
Učinkovitost kojom će elicitor potaknuti proizvodnju specijaliziranih metabolita u biljci ovisi o kompleksnoj interakciji elicitora i stanica biljke. Neki su od glavnih faktora koji utječu na tu interakciju specifičnost elicitora, njegova koncentracija i intervali primjene, te genetske karakteristike i fiziološko stanje biljke (Vasconsuelo i sur., 2007; Baenas i sur., 2014). Elicitori mogu utjecati na biljni specijalizirani metabolizam modulirajući razinu biosinteze, akumulacije i/ili vakuolarnog prijenosa, pretvorbe te degradacije specijaliziranih metabolita. Iako je mehanizam djelovanja elicitora prvenstveno vezan za specijalizirani metabolizam, novija istraživanja ukazuju da elicitacija može modulirati i primarni metabolizam. Primjerice, elicitacija metil-jasmonatom inducira promjene u središnjim

metaboličkim putevima utječući time na specijalizirani metabolizam vrste *Medicago truncatula* u staničnoj kulturi (Broeckling i sur., 2005). Također, eksperimentalno je dokazano kako suspenzija stanica maka (*Papaver somniferum*) tretirana fungalnim elicitorom dovodi do indukcije aktivnosti glutation S-transferaze (Yu i Facchini, 2000). S tim u vezi, postoji mogućnost da elicitacija uzrokuje promjene u ekspresiji molekula primarnog metabolizma uključenih u vakuolarni transport te pritom regulira razine specijaliziranih metabolita. Dodatne analize čimbenika uključenih u kontrolu procesa prijenosa i pohrane prijekopotrebnih elemenata imaju potencijalnu primjenjivost u biotehnološkim okvirima (Vasconsuelo i sur., 2007).

Koncentracija elicitora čimbenik je koji snažno utječe na intenzitet biljnog odgovora i prema njoj se određuje efektivna doza, što ovisi o vrsti biljke te se određuje isključivo empirijski. Različite razine elicitora mogu drugačije djelovati u pojedinim biljnim sustavima ovisno o različitim osjetljivostima molekularnih mehanizama. Općenito, vrijeme potrebno za maksimalnu akumulaciju određenog specijaliziranog metabolita specifično je za vrstu i ovisi o povećanoj aktivnosti metaboličkih enzima. Zbog svega navedenog, potrebno je odrediti optimalne uvjete elicitacije (vrijeme elicitacije i koncentraciju elicitora) za svaki pojedini sustav (Vasconsuelo i sur., 2007).

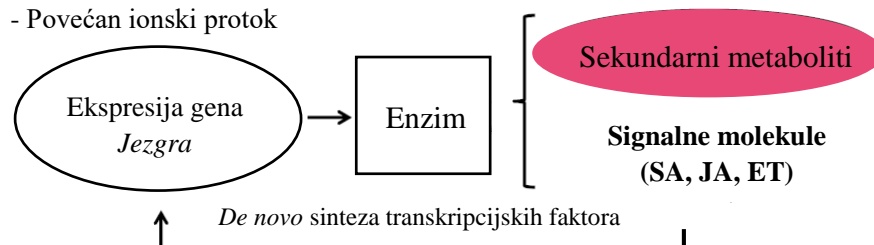
Ukoliko je elicitor biotičkog podrijetla, npr. razni patogeni, u većini slučajeva odgovor biljke spram bolesti genetski će biti kontrolirana biljnim genima otpornosti (rezistencije, eng. *R genes*) i genima avirulencije patogena (eng. *Avr genes*), tzv. koncept „gen za gen“ interakcije (García-Brugger i sur., 2006). Međutim, do razvoja otpornosti ne će uvijek doći zbog specifičnih produkata gena avirulencije patogena koji aktiviraju obrambene odgovore u kultivara koji posjeduju odgovarajuće gene otpornosti (*R*), već će biti posljedica djelovanja općih elicitora koji su sposobni potaknuti obrambene mehanizme u različitim kultivarima

jedne ili više vrsta. Prvi korak u obrambenom odgovoru biljaka spram elicitora jest percepcija stimulansa receptorima na plazmatskoj membrani biljne stanice (Slika 1) kao što su protein kinaze, ili receptorima unutar stanice koji iniciraju signalne procese koji zatim aktiviraju obrambeni odgovor. Biljke odgovaraju nizom obrambenih mehanizama koji uključuju: indukciju proteina povezanih s patogenezaom i enzima zaštite od oksidativnog stresa, odgovore koje karakterizira brza stanična smrt u neposrednoj blizini mjesta izlaganja patogenima, stvaranje reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih (RNS) spojeva, aktivaciju obrambenih gena, promjene potencijala plazmatske membrane i pojačani ionski protok (izlazak  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  i unos  $\text{Ca}^{2+}$ ), nagle promjene u procesima fosforilacije proteina, oksidacije lipida i strukturi stanične stijenke poput lignifikacije, te aktivaciju i *de novo* biosintezu transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju gena uključenih u stvaranje specijaliziranih metabolita (Baenas i sur., 2014).



#### Obrambeni odgovori (SAR, ISR)

- ROS i RNS
- Fosforilacija proteina
- Povećan ionski protok



(Opis slike na sljedećoj stranici)

**Slika 2.** Opći mehanizam nakon percepcije elicitora. Skraćenice: SAR (eng. *systemic acquired response*) = sustavno stečena rezistencija, ISR (eng. *induced systemic resistance*) = inducirana sustavna rezistencija, ROS (eng. *reactive oxygen species*) = reaktivne kisikove vrste, RNS (eng. *reactive nitrogen species*) = reaktivne dušikove vrste, NADPH (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) = nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, SA (eng. *salicylic acid*) = salicilna kiselina, JA (eng. *jasmonic acid*) = jasmonska kiselina, ET (eng. *ethylene*) = etilen. Preuzeto i prilagođeno prema radu Baenas i sur. (2014).

## 1.6. Učinak elicitora na fitokemijski profil biljaka

S obzirom da je mogućnost proizvodnje specijaliziranih metabolita u biljaka mala, iznosi do 1% suhe mase biljke, i uz to ovisi o fiziološkom i razvojnom stadiju biljke (Oksman-Caldentey i Inze, 2004), mogućnost egzogene primjene elicitora za povećanje udjela pojedinih metabolita zanimljiv je pristup kojim bi se bez upotrebe umjetnih gnojiva ili tehnika genetičkog inženjerstva, koje i dalje nisu široko dostupne i mogu biti financijski zahtjevne, mogao poboljšati kemijski sastav biljaka. Tip elicitora, doza, kao i vrijeme upotrebe značajno utječu na intenzitet biljnog obrambenog odgovora (Slika 3).

BILJKA	ELICITOR		BIOAKTIVNE TVARI
<b>Genetske karakteristike</b> Vrste, kultivari	<b>Doza</b> Primjena različitih koncentracija	→	Fenolni spojevi Glukozinolati Karotenoidi Betalaini Vitamini Ostalo
<b>Fiziološko stanje</b> Sjemenke, klice, zrele biljke	<b>Okoliš</b> Abiotički (kemijski i fizikalni), biotički		
<b>Okolišni faktori</b> Svjetlost, temperatura	<b>Način primjene</b> Hidroponika, folijarna prihrana		
<b>Agronomski uvjeti</b> Navodnjavanje, zemlja, plodnost tla	<b>Sinergistički učinak</b> Kombinacija aditiva ili antagonista		
<b>Obrada i skladištenje</b> Prijevoz, temperatura, vlaga	<b>Interval tretmana</b> Akutni, dugoročni (sati, dani)		

**Slika 3.** Čimbenici koji utječu na koncentraciju bioaktivnih spojeva u biljci tijekom obrambenog odgovora spram okolišnih uvjeta (preuzeto i prilagođeno prema radu Baenas i sur. (2014)).

Elicitori mogu utjecati na sintezu različitih skupina bioaktivnih spojeva biljaka i to na različit način, poticati je ili inhibirati (Baenas i sur., 2014). Fiziološko stanje biljke također igra važnu ulogu u sposobnosti njenog odgovora spram elicitora, tijekom eksponencijalne faze rasta biljke kada je koncentracija bioaktivnih spojeva veća (Cevallos-Casals i Cisneros-Zevallos, 2010), kao i uz prisutnost regulatora rasta (Vallejo i sur., 2003), odgovor biljke je intenzivniji. Uz to, moguća je i primjena kombinacije elicitora, pri čemu njihovo međudjelovanje može biti antagonističko ili sinergističko, a posljedica toga negativan ili aditivni učinak na odgovor biljke (Cho i sur., 2008).

Nedavno su objavljeni rezultati istraživanja utjecaja različitih izvora selena primijenjenih preko korijena i lista na anatomske i fiziološke karakteristike rotkvice (da Silva i sur., 2020), te utjecaja nanočestica titanijeva dioksida na fotosintetski i antioksidativni sustav rotkvice (Tighe-Neira, 2020). Tretman selenom rezultirao je fiziološkim povećanjem stomatalne provodljivosti, brzine transpiracije te instantne efikasnosti upotrebe vode. Primjena je također utjecala i na anatomske karakteristike poput veličine provodnih žila, ksilemske površine i broja ksilemskih stanica u listovima i korijenu ovisno o formi egzogeno dodanog elicitora i lokaciji aplikacije (da Silva i sur., 2020). Tretman titanijevim dioksidom je pak rezultirao povećanjem brzine fotosinteze i stomatalne provodljivosti neovisno o dozi i veličini čestica. Također, koncentracija fenolnih spojeva povećala se porastom količine upotrebljenih nanočestica. Općenito, pozitivan učinak titanijeva dioksida na fotosintezu pripisuje se difuzijskim učincima uz povećanje efikasnosti upotrebe vode te neznatne aktivacije specijaliziranog metabolizma (Tighe-Neira, 2020).

### **1.7. Učinak elicitora na antioksidacijski kapacitet biljaka**

Oksidativni stres, na molekularnoj razini, predstavlja povećanje koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje mogu imati izrazito snažan negativan učinak na stanice, ali i organizam u cjelini. Slobodni radikali i drugi oksidansi stalno se proizvode kao nusprodukti aerobnog metabolizma, a njihova prekomjerna zastupljenost može izrazito regresivno djelovati na brojne fiziološke i biokemijske procese u različitim organizmima (Lee i sur., 2017; Alam i sur., 2013). Kompleksni sustavi enzimatskih i neenzimatskih antioksidacijskih mehanizama obrane koji su prirodno prisutni u biljci mogu biti pojačani egzogenom primjenom različitih elicitora (Świeca i sur., 2015).

Jedan od primjera prirodnih, netoksičnih elicitora jest hitozan za kojeg je dokazano da može aktivirati biljni obrambeni odgovor uzrokujući pritom biosintezu fitokemikalija, naročito farmakološki aktivnih flavonoida u vrsti *Isatis tinctoria* L. (Jiao i sur., 2018). Također, elicitacija salicilnom kiselinom i fenilpropanoidnim prekursorima (primjerice šikiminskom kiselinom) izrazito pozitivno djeluje na porast aktivnosti i efikasnosti sintetskog puta fenolnih spojeva, snažno povećavajući antioksidativnu aktivnost i time nutritivnu vrijednost te primijenjivost klica heljde (Świeca, 2014). Nadalje, kemijski spojevi poput poliamina, salicilne, jasmonske, apscizinske i arahidonske kiseline uključeni su u stresne odgovore u biljkama (Ramakrishna i Ravishankar, 2011). Osim što sudjeluju u povećanju otpornosti biljaka, egzogenom upotrebom istih kao elicitora može se potaknuti sintezu bioaktivnih spojeva koji povećavaju antioksidacijski kapacitet biljaka, a posredno onda doprinijeti i zdravstvenoj vrijednosti biljke za čovjeka (Kim i sur., 2007).

Općenito, brojni biotički čimbenici poput ekstrakta origana, ribljeg proteinskog hidrolizata, laktoferina i sl. (Randhir i sur., 2004; Shetty i sur., 2002), ali i abiotički kao mehanički pritisak i UV zračenje (Doblado, 2007; Świeca i sur. 2014.) imaju sličan princip djelovanja koji se bazira na indukciji protektivnih molekula u stanici kao odgovor biljaka na stres čime se povećava njihov antioksidacijski potencijal. Učinak svakog pojedinog egzogeno dodanog elicitora na određenu biljnu vrstu i razvojnu fazu može imati vrlo specifičan odgovor, rezultirajući različitim fitokemijskim sastavom i antioksidacijskim potencijalom.

## **1.8. Učinak elicitora na aktivnost enzima $\alpha$ -glukozidaza**

Enzim  $\alpha$ -glukozidaza tip je glikozid-hidrolaze koji katalizira hidrolizu terminalne  $\alpha$ -1,4-glukoze s nereducirajućeg kraja složenih šećera. Nalazimo je u životinjama, biljkama,

bakterijama i gljivama (Tomasik i Horton, 2012). U ljudskom probavnom sustavu,  $\alpha$ -glukozidaza nalazi se na mikroresicama tankog crijeva, gdje sudjeluje u krajnjem koraku razgradnje ugljikohidrata, tj. u hidrolizi disaharida i oligosaharida do monosaharida koji se mogu apsorbirati kroz sluznicu (Scheen, 2007). Ukoliko dođe do nepravilnosti u njenoj aktivnosti, dolazi do povećanja koncentracije glukoze u krvi – hiperglikemije, i nastanka dijabetesa tipa 2 (Apostolidis i sur., 2007). Zbog ovih razloga, kontrola apsorpcije glukoze inhibicijom  $\alpha$ -glukozidaze efektivan je način liječenja dijabetesa tipa 2 (Baenas i sur., 2016). Također, njena inhibicija dovodi do snižavanja razine triglicerida u plazmi, ublažavanja kardiovaskularnih poremećaja i hipertenzije (Phan i sur., 2013).

Kako se i dijabetes i kardiovaskularni poremećaji kod ljudi pojavljuju sve češće i sve ranije tijekom života, sintetizirano je više tipova inhibitora  $\alpha$ -glukozidaze poput akarboze, miglitola i vogliboza. Međutim, uz njihovo korištenje mogu se pojaviti nuspojave kao što su nadutost, proljev i bolovi u trbuhu (Phan i sur., 2013). Stoga su intenzivna istraživanja za prirodnim i za organizam lakše podnošljivim inhibitorima iz biljaka. Jedan tip biljnih bioaktivnih spojeva koji mogu inhibirati ljudske enzime su fenolni spojevi (Fraga i sur., 2010). Upravo za klice rotkvice dokazano je da smanjuju razinu glukoze *Drosophila melanogaster* (Baenas i sur., 2016). Inače, enzim  $\alpha$ -glukozidaza, osim u čovjeku, ima važnu ulogu i u biljkama; naime, sudjeluje u klijanju i kontrolira polisaharidni sastav biljke tijekom njenog rasta (Tomasik i Horton, 2012).



## 1.9. Opći i specifični ciljevi rada

Nastojanja da se poveća prehrambenu i zdravstvenu vrijednost biljaka tehnikama i metodama povećavanja koncentracije njihovih specijaliziranih metabolita sve su učestalija. Jedan od načina kako u biljci izazvati fiziološke promjene koje će dovesti do povećanja koncentracije određenih metabolita jest primjena elicitora. Elicitori su supstance, biotičkog ili abiotičkog podrijetla, te biljni hormoni koji induciraju specifične odgovore u biljkama rezultirajući povećavanjem koncentracije određenih bioaktivnih tvari (Naik i Al-Khayri, 2016; Baenas i sur., 2014).

**Opći cilj** našeg rada bio je usporediti učinak tri različita tipa elicitora, natrijeva klorida (sol), saharoze (ugljikohidrat) i salicilne kiseline (biljni hormon), na fitokemijski sastav i antioksidacijski kapacitet klica rotkvice (*Raphanus sativus* L.), te njihov učinak na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze, jednog od ključnih enzima dijabetesa tipa 2. Koristili smo tri različite koncentracije svakog od elicitora (vodene otopine natrijeva klorida 0,1, 1, i 10 mg/mL, saharoze 0,1, 1 i 10 mg/mL, te salicilne kiseline 0,01, 0,1 i 0,5 mg/mL), odabrane prema podacima iz znanstvenih radova slične tematike (Li i Zhu, 2018; Natella i sur., 2016; Guo i sur, 2013; Guo i sur, 2011a i b; Yuan i sur., 2010). Kao kontrolnu skupinu koristili smo klice koje smo, umjesto otopinama elicitora, tretirali deioniziranom vodom.

**Specifični ciljevi** obuhvatili su istraživanje utjecaja elicitora na:

### 1) fitokemijski sastav klica na razini

- a) ukupnih fenola i flavonoida,
- b) tanina,
- c) proantocijanidina,
- d) glukozinolata,
- e) proteina,

- d) topivih šećera,
- e) ukupnih i pojedinačnih fotosintetskih pigmenata (klorofili *a* i *b*, te karotenoidi  $\beta$ -karoten i likopen) upotrebom različitih spektrofotometrijskih metoda,
- f) *L*-askorbinske kiseline (vitamin C), sinapinske, ferulične, klorogenske, kavene, benzojeve i salicilne, te
- g) flavonoida kempferola i kvercetina, i njihovih derivata upotrebom metode tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja.

2) antioksidacijski kapacitet klica upotrebom triju različitih spektrofotometrijskih metoda - ABTS, FRAP i ORAC,

3) aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze upotrebom metode mjerenja stupnja inhibicije ovog enzima.

4) Za procjenu statističke značajnosti promjena vrijednosti prethodno navedenih parametara koristili smo jednosmjernu analizu varijance (ANOVA) te test "*Duncan's New Multiple Range Test*" (DNMRT), tj. *post hoc* test višestrukih usporedbi. S obzirom da smo izmjerili puno različitih parametara za svaku skupinu klica, proveli smo tzv. analizu glavnih komponenata (*Principal Component Analysis*, PCA) kako bismo cijeli set podataka sveli na dvije glavne komponente (PC1 i PC2) i olakšali si isticanje značaja (doprinosa) svakog od izmjerenih parametara pojedinoj skupini klica. Također, PCA nam je omogućila i uvid u međusobno grupiranje, tj. odnose između skupina klica s obzirom na izmjerene parametre. Uz ovu tehniku, proveli smo i hijerarhijsko klasteriranje (*Hierarchical Clustering*, HC) kako bismo vizualizirali homogene, tj. jasno separirane skupine klica na temelju izmjerenih parametara. Naposljetku smo odredili međusobne odnose, tj. korelacije između pojedinih parametara analizom Pearsonovih koeficijenata korelacije.

## **2. MATERIЈAL I METODE**

## Popis korištenih kemikalija:

- AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propan) dihidroklorid),  $C_8H_{18}N_6 \times 2HCl$  (Sigma Aldrich)
- ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina),  $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$  (BioChemica)
- acetatni pufer,  $CH_3COOH/CH_3COONa$  (J.T. Baker)
- aceton,  $C_3H_6O$  (Gram mol)
- amonijev klorid,  $AlCl_3$  (Kemika)
- Bradford reagens (Sigma Aldrich)
- cijanidin-3-glukozid,  $C_{21}H_{21}O_{11}^+ Cl^-$  (Extrasynthese)
- cimetna kiselina,  $C_6H_5CH=CHCOOH$  (Extrasynthese)
- etanol,  $C_2H_5OH$  (Gram mol)
- fluorescein,  $C_{20}H_{12}O_5$  (Sigma Aldrich)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika)
- fosfatni pufer,  $NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4$ ; pH 7,0 (Kemika)
- galna kiselina,  $C_7H_6O_5$  (Extrasynthese)
- goveđi serumski albumin (Sigma Aldrich)
- Izosan<sup>®</sup>G (natrijev dikloroizocijanurat dihidrat),  $Cl_2Na(NCO)_3 \times 2H_2O$  (Pliva)
- kalijev klorid,  $KCl$  (Alkaloid)
- kalijev peroksidisulfat,  $K_2S_2O_8$  (VWR CHEMICALS)
- katehin,  $C_{15}H_{14}O_6$  (Sigma Aldrich)
- klorovodična kiselina,  $HCl$  (Kemika)
- metanol,  $CH_3OH$  (J.T. Baker)
- natrijev acetat,  $CH_3COONa \times 3H_2O$  (Kemika)
- natrijev hidroksid,  $NaOH$  (Kemika)
- natrijev karbonat,  $Na_2CO_3$  (Gram mol)
- natrijev klorid,  $NaCl$  (Lachner)
- natrijev nitrit,  $NaNO_2$  (Kemika)
- natrijev tetraklorpaladat,  $Na_2PdCl_4$  (Acros organics)
- *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D glukopiranozid,  $C_{12}H_{15}NO_8$  (Acros organics)
- saharoza,  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (Pancreac)
- salicilna kiselina,  $C_7H_6O_3$  (Sigma Aldrich)

- sinigrin, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>KNO<sub>9</sub>S<sub>2</sub> (Sigma Aldrich)
- sumporna kiselina, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kemika)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub> (Sigma Aldrich)
- trolox (5-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> (ACRÖS ORGANICS®)
- vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid), C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> (Sigma Aldrich)
- željezov-(II)-klorid, FeCl<sub>2</sub> (Gram mol)

## 2.1. Uzgoj klica i tretman elicitorima

Sjemenke rotkvice (*Raphanus sativus* L.) kupljene su od firme Agromlinar d.o.o. (Zagreb, Republika Hrvatska). Uzgoj, tretmani i sakupljanje biljnog materijala ponovljeni su tri puta (tri biološke replike) i provedeni u razdoblju od studenoga 2019. do veljače 2020. godine. Sjemenke su sterilizirane 2,55%-tnom vodenom otopinom komercijalnog sredstva za sterilizaciju biljnog materijala, Izosan®G, u trajanju od 20 minuta, nakon čega su temeljito isprane deioniziranom vodom i postavljene na vlažni filter-papir u mrak na temperaturu od 23 °C i stupanj vlage 65%. Nakon četiri dana klijanja u mraku, klice su stavljene na režim svjetlosti 16 h dan/8 h noć (uz isti stupanj vlage, 65%), te je peti dan uklonjen ostatak vode iz podloge i dodan volumen od 10 mL vodene otopine pojedinog elicitora na 40 klica (visina stupca otopine bila je otprilike 5 mm i pokrivala je korijen klica, ali nije dodirivala kotiledone). Koncentracije vodenih otopina elicitora bile su sljedeće: otopine natrijeva klorida 0,1, 1, i 10 mg/mL, otopine saharoze 0,1, 1 i 10 mg/mL, te otopine salicilne kiseline 0,01, 0,1 i 0,5 mg/mL. Kao kontrola korištena je grupa klica kojoj smo, umjesto otopine elicitora, dodali isti volumen deionizirane vode. Klice i pripadajuće otopine bile su u zatvorenim plastičnim prozirnim klijalštima tako da je volumen otopine bio konstantan, tj. nije došlo do isparavanja vode i mogućeg povećanja koncentracije elicitora. Svaka biološka replika pojedinog tretmana sastojala se od otprilike 80 klica (dva klijalšta ispunjena

klicama). Tretman elicitorima, tj. inkubacija klica u otopinama trajala je 72 sata, nakon čega smo pažljivo sakupili kotiledone i hipokotile klica, temeljito ih isprali deioniziranom vodom, posušili papirnatim ručnikom, smrznuli pod tekućim dušikom i liofilizirali. Liofilizirani materijal smo pomoću tučka i tarionika usitnili u prah i čuvali u epruvetama na sobnoj temperaturi do analiza.

## **2.2. Mjerenje ukupnih fenola**

Metodu određivanja sadržaja ukupnih fenola proveli smo prema radu autora Singleton i sur. (1999). Koristili smo etanolni ekstrakt koncentracije 15 mg/mL. U 553  $\mu\text{L}$  deionizirane vode dodali smo 35  $\mu\text{L}$  reagensa FC (Folin Ciocalteu) i 7  $\mu\text{L}$  ekstrakta. Nakon što smo uzorak dobro promiješali, dodali smo 105  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Kao negativnu kontrolu koristili smo 70%-tni etanol (v/v). Nakon inkubacije od 30 minuta pri 45°C u termostatiranoj tresilici, mjerili smo apsorbanciju uzoraka pri 765 nm na spektrofotometru.

Koncentraciju ukupnih fenola odredili smo posredno korištenjem baždarne krivulje poznatih koncentracija galne kiseline (0,05, 0,01, 0,25, 0,5, 0,75, 1 mg/mL) i izrazili kao miligram ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase (mg EGK/g SM).

## **2.3. Mjerenje ukupnih flavonoida**

Metodu određivanja sadržaja ukupnih flavonoida proveli smo prema radu autora Pourmorad i sur. (2006). U 280  $\mu\text{L}$  deionizirane vode dodali smo 21  $\mu\text{L}$  5%-tne vodene otopine  $\text{NaNO}_2$  (v/v) i 7  $\mu\text{L}$  etanolnog ekstrakta klica koncentracije 15 mg/mL. Nakon inkubacije od 5 minuta pri sobnoj temperaturi, dodali smo 21  $\mu\text{L}$  10%-tne vodene otopine  $\text{AlCl}_3$ . Nakon sljedeće inkubacije od 6 minuta pri sobnoj temperaturi, dodali smo 140  $\mu\text{L}$  1

M NaOH<sub>(aq)</sub> i 168  $\mu$ L deionizirane vode. Kao negativnu kontrolu koristili smo 70%-tni etanol (v/v). Apsorbanciju uzoraka mjerili smo pri 520 nm na spektrofotometru.

Koncentraciju ukupnih flavonoida odredili smo posredno korištenjem baždarne krivulje poznatih koncentracija galne kiseline (0,05, 0,01, 0,25, 0,50, 0,75, 1 mg/mL) kao miligram ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase (mg EGK/g SM).

## **2.4. Mjerenje ukupnih tanina**

Metodu određivanja sadržaja ukupnih tanina proveli smo prema radu autora Singleton i sur. (1999). Koristili smo etanolni ekstrakt koncentracije 15 mg/mL. U 840  $\mu$ L deionizirane vode dodali smo 50  $\mu$ L reagensa FC (Folin Ciocalteu), 100  $\mu$ L 3,5%-tog Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v) i 10  $\mu$ L ekstrakta. Nakon što smo uzorak dobro promiješali, dodali smo 105  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Kao negativnu kontrolu koristili smo 70%-tni etanol (v/v). Nakon inkubacije od 30 minuta pri 45°C u termostatoranoj tresilici, mjerili smo apsorbanciju uzoraka pri 765 nm na spektrofotometru.

Koncentraciju ukupnih tanina odredili smo posredno korištenjem baždarne krivulje poznatih koncentracija galne kiseline (0,05, 0,01, 0,25, 0,50, 0,75, 1 mg/mL) i izrazili kao miligram ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase (mg EGK/g SM).

## **2.5. Mjerenje ukupnih proantocijanidina**

Metodu određivanja ukupne proantocijanidina proveli smo prema radu autora Di Stefano i Guidoni (1989). Koristili smo metanolni ekstrakt (80%-tni, v/v) koncentracije 15 mg/mL. U 450  $\mu$ L 4%-tnog vanilina otopljenog u 80%-tnom metanolu (v/v) dodali smo 75  $\mu$ L otopine klorovodične kiseline i 25  $\mu$ L ekstrakata. Kao negativnu kontrolu koristili smo

80%-tni metanol. Nakon inkubacije od 15 minuta pri sobnoj temperaturi, mjerili smo apsorbanciju uzoraka pri 520 nm na spektrofotometru.

Koncentraciju ukupnih proantocijanidina odredili smo posredno korištenjem baždarne krivulje poznatih koncentracija katehina (0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 5 mg/mL) i izrazili kao miligram ekvivalenta katehina po gramu suhe mase (mg EK/g SM).

## 2.6. Mjerenje ukupnih topivih šećera

Metodu određivanja sadržaja ukupnih topivih šećera proveli smo prema radu autora Dubois i sur (1956). Koristili smo etanolni ekstrakt koncentracije 0,5 mg/mL. U 500  $\mu$ L koncentrirane  $H_2SO_4$  dodali smo 100  $\mu$ L 5%-tne otopine fenola (w/v) i 200  $\mu$ L ekstrakta. Kao negativnu kontrolu koristili smo 70%-tni etanol (v/v). Nakon inkubacije od 10 minuta, mjerili smo apsorbanciju uzoraka pri 485 nm na spektrofotometru.

Koncentraciju ukupnih topivih šećera odredili smo posredno korištenjem baždarne krivulje poznatih koncentracija saharoze (0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg/mL) i izrazili kao miligram ekvivalenta saharoze po gramu suhe mase (mg ES/g SM).

## 2.7. Mjerenje ukupnih proteina

Metodu po Bradfordu za određivanje sadržaja ukupnih proteina proveli smo prema radu autora Bonjoch i Tamayo (2001). Koristili smo etanolni ekstrakt koncentracije 15 mg/mL. U 1 mL reagensa Bradford dodali smo 20  $\mu$ L ekstrakta. Kao negativnu kontrolu koristili smo 70%-tni etanol (v/v). Kao standard koristili smo sedam uzoraka otopina goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA), koncentracija od 5  $\mu$ g/mL do 100  $\mu$ g/mL. Nakon inkubacije od 30 minuta pri sobnoj temperaturi, mjerili smo apsorbanciju pri 595 nm na spektrofotometru.



Koncentraciju ukupnih proteina odredili smo posredno korištenjem baždarne krivulje poznatih koncentracija govedjeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA) (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL) i izrazili kao miligram ekvivalenta BSA po gramu suhe mase (mg EBSA/g SM).

## 2.8. Mjerenje ukupnih intaktnih glukozinolata

Metodu određivanja sadržaja ukupnih intaktnih glukozinolata proveli smo prema radu autora Heaney i Fenwick (1980) i O'Callaghan i sur. (2000). Koristili smo etanolni ekstrakt koncentracije 15 mg/mL. Ekstrakciju glukozinolata proveli smo u kipućem 80%-tnom metanolu (v/v) na termostatiranoj tresilici u trajanju od 2 minute i pri 350 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja uzoraka 5 minuta pri 13 000 rpm, inkubirali smo ih 10 minuta na +4° C. Volumen od 23 µL supernatanta dodali smo u 690 µL 2 mM Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>. Kao negativnu kontrolu koristili smo 80%-tni metanol (v/v). Nakon inkubacije od 60 minuta, mjerili smo apsorbanciju uzoraka pri 405 nm na spektrofotometru.

Koncentraciju ukupnih intaktnih glukozinolata odredili smo posredno korištenjem baždarne krivulje poznatih koncentracija sinigrina (0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 mg/mL) i izrazili kao miligram ekvivalenta sinigrina po gramu suhe mase (mg ESIN/g SM).

## 2.9. Mjerenje ukupnih fotosintetskih pigmenata

Metodu određivanja fotosintetskih pigmenata proveli smo prema radu autora Sumanta i sur. (2014). Koristili smo acetonski ekstrakt (80%-tni, v/v) koncentracije 15 mg/mL. Nakon što smo smjesu promiješali na vrtložnoj mješalici i centrifugirali na sobnoj temperaturi 5 minuta pri 6 000 rpm, odvojili smo supernatant. Talog smo još dva puta ekstrahirali 80%-

tnim acetonom (v/v %) dok nije postao potpuno bijeli. Apsorbancije uzoraka mjerili smo pri 470, 575, 590, 628, 645 i 663 nm na spektrofotometru.

Koncentracije klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila, karotenoida,  $\beta$ -karotena i likopena u mg/g SM izračunali smo prema formulama:

$$\text{Klo } a = 12,25 A_{663} - 2,79 A_{645}$$

$$\text{Klo } b = 21,5 A_{645} - 5,1 A_{663}$$

$$\text{Klo} = \text{Klo } a + \text{Klo } b$$

$$\text{Kar} = (1000 A_{470} - 1,82 \text{ Klo } a - 85,02 \text{ Klo } b) / 198$$

$$\beta\text{-karoten} = 0,216 A_{663} - 1,22 A_{645} - 0,304 A_{505} + 0,452 A_{453}$$

$$\text{Likopen} = - 0,0458 A_{663} + 0,204 A_{645} - 0,304 A_{505} + 0,452 A_{453}$$

pri čemu je:

A = apsorbancija (pri odgovarajućoj valnoj duljini)

Klo = klorofil

Kar = karotenoidi

## 2.10. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija individualnih fenolnih spojeva i vitamina C metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja

Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja (eng. *High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC) koristi se za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Proveli smo je u svrhu kvalitativne i kvantitativne analize glikozida i aglikona fenolnih spojeva, te vitamina C (*L*-askorbinske kiseline) klica rotkvice. Za analize koristili smo nehidrolizirane etanolne ekstrakte koncentracije 15 mg/mL, te hidrolizirane etanolne ekstrakte koncentracije 13,5 mg/mL. Hidrolizirane ekstrakte priredili smo na sljedeći način: na 200 µL ekstrakta dodali smo koncentriranu klorovodičnu kiselinu (HCl) tako da je njena konačna koncentracija iznosila 1,2 M. Uzorke smo zatim 2 sata inkubirali na termostatiranoj tresilici pri temperaturi od 80 °C i 300 okretaja u minuti. Nakon završetka hidrolize, ekstrakte smo do daljnje upotrebe skladištili na -80 °C.

Za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju spojeva koristili smo uređaj Agilent 1100 Series s UV/VIS detektorom. Razdvajanje smo proveli na nepolarnoj koloni Poroshell 120 SB-C18 dimenzija 4,6 x 75 mm s veličinom čestica 2,7 µm uz upotrebu pretkolone Zorbax Rx-C18 dimenzija 4,6 x 12,5 mm s veličinom čestica 5 µm. Metodu razdvajanja, identifikacije i kvantifikacije proveli smo prema radu Šola i sur. (2020).

Flavonoide smo analizirali pri valnoj duljini od 360 nm, fenolne kiseline pri 310 nm, a *L*-askorbinsku kiselinu pri 254 nm. Spojeve smo identificirali usporedbom retencijskih vremena pikova dobivenih analizom ekstrakata s retencijskim vremenima pikova dobivenih analizom standarda. Kvantifikaciju spojeva proveli smo upotrebom baždarnih pravaca odgovarajućih standarda (Tablica 2) prema formuli:

$$x = \frac{y-b}{a} \text{ (mg/kg)}$$

pri čemu je:

x = masa spoja

y = apsorbancija

Baždarne pravce za svaki spoj definirali smo analizom otopina različitih koncentracija (0,01 - 0,25 mg/mL) standarda istom metodom kao i za ekstrakte, a jednadžbe i  $R^2$  vrijednosti prikazane su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Jednadžbe baždarnih pravaca i  $R^2$  vrijednosti standarda fenolnih spojeva

<b>Spoj</b>	<b>Jednadžba baždarnog pravca</b>	<b><math>R^2</math></b>
<i>L</i> -askorbinska kiselina	$y = 649,31x - 42,759$	0,9987
Benzojeva kiselina	$y = 1052,6x - 12,738$	0,9989
Klorogenska kiselina	$y = 778,44x - 39,015$	0,9993
Kavena kiselina	$y = 2205,2x - 53,223$	0,9991
Salicilna kiselina	$y = 448,73 + 1,1952$	0,9989
Ferulična kiselina	$y = 2643,1x - 41,428$	0,9985
Sinapinska kiselina	$y = 2391,9x - 53,69$	0,9982
Kvercetin	$y = 992,73x - 25,98$	0,9991
Kempferol	$y = 1705,1 - 22,937$	0,9993
Kvercetin-3,4-di- <i>O</i> -glukozid	$y = 3502,6x + 40,25$	0,9990
Kvercetin-3-D-glukozid	$y = 1182,5x - 40,06$	0,9992
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	$y = 413,75x + 3,2504$	0,9990
Kempferol-3- <i>O</i> -glukozid	$y = 989,2x - 14,24$	0,9988
Kempferol-3- <i>O</i> -rutinozid	$y = 1705,1x - 22,937$	0,9954

## 2.11. Test inhibicije enzima $\alpha$ -glukozidaze

Za određivanje stupnja inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze koristili smo metodu prema radovima autora Nampoothiri i sur. (2011), te Vinholes i sur. (2011). Koristili smo metanolni ekstrakt koncentracije 15 mg/mL. U 100  $\mu$ L glukozidaze (56,6 mU/mL) dodali smo 20  $\mu$ L ekstrakta. Nakon inkubacije od 10 minuta pri 37°C u termostatiranoj tresilici, reakciju smo inicirali dodatkom 100  $\mu$ L 2 mM *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D glukopiranozida kao supstrata u 100 mM fosfatnog pufera (pH 7.0). Nakon druge inkubacije od 20 minuta pri 37 °C u temostatiranoj tresilici, reakciju smo zaustavili dodatkom 500  $\mu$ L 1 M otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Kao negativnu kontrolu koristili smo 70%-tni etanol (v/v). Kao pozitivnu kontrolu koristili smo 6 mg/mL otopine akarboze. Apsorbanciju uzoraka mjerili smo pri 405 nm na spektrofotometru.

Postotak inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze izračunali smo prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_k - A_u}{A_k} * 100$$

pri čemu je:

$A_k$  - apsorbancija akarboze, pozitivne kontrole

$A_u$  - apsorbancija uzorka

## 2.12. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka metodom ABTS

Metodu ABTS proveli smo prema radu autora Re i sur. (1998). Koristili smo etanolni ekstrakt koncentracije 15 mg/mL. Otopinu ABTS<sup>•+</sup> radikala pripremili smo 24 sata prije same analize miješanjem 140 mM otopine kalijevog peroksidisulfata i 7 mM reagensa ABTS. Na dan analize 96%-tnim etanolom (v/v) razrijedili smo ABTS otopinu do konačne koncentracije od 1% (v/v), tako da apsorbancija te otopine iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . 700  $\mu$ L tako pripremljenog reagensa ABTS pomiješali smo s 7  $\mu$ L ekstrakta. Kao negativnu kontrolu koristili smo 96%-tni etanol (v/v). Kao standard koristili smo 100 mM Troloxa. Nakon inkubacije od 6 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi, mjerili smo apsorbanciju uzoraka pri 740 nm na spektrofotometru.

Postotak inhibicije ABTS<sup>•+</sup> radikala izračunali smo prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_k - A_u}{A_k} * 100$$

$A_k$  = apsorbancija negativne kontrole

$A_u$  = apsorbancija uzorka

## 2.13. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka metodom FRAP

Metodu FRAP proveli smo prema radu autora Benzie i Strain (1999). Koristili smo etanolni ekstrakt koncentracije 3 mg/mL. Reagens FRAP pripremili smo miješanjem acetatnog pufera (300 mM; pH 3,6), otopine TPTZ (10 mM u 40 mM kloridnoj kiselini; te

željezova(II) klorida (20 mM) u omjeru 10:1:1 (v/v/v). Na 665  $\mu\text{L}$  reagensa FRAP dodali smo 35  $\mu\text{L}$  ekstrakta. Kao negativnu kontrolu koristili smo 70%-tni etanol (v/v). Kao standard koristili smo 100 mM Trolox. Nakon inkubacije od 4 minute pri sobnoj temperaturi, mjerili smo apsorbanciju uzoraka pri 595 nm na spektrofotometru.

Postotak redukcije željezova(III) tripiridiltriazin kompleksa ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) izračunali smo prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_u - A_k}{A_u} * 100$$

pri čemu je:

$A_k$  = apsorbancija negativne kontrole

$A_u$  = apsorbancija uzorka

## 2.14. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka metodom ORAC

Metodu ORAC proveli smo prema radu autora Haile i Kang (2019). Koristili smo metanolni (70%-tni, v/v) ekstrakt koncentracije 15 mg/mL. Priredili smo 10 mM fosfatni pufer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,0) te u njemu pripremili 25 mM otopinu fluoresceina. U istom puferu priredili smo i 120 mM reagens AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propan) dihidroklorid) kao izvor radikala. Volumen od 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta dodali smo u 300  $\mu\text{L}$  fluoresceina. Nakon inkubacije od 10 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi, u svaki uzorak dodali smo 50  $\mu\text{L}$  reagensa AAPH. Kao negativnu kontrolu koristili smo 70%-tni metanol (v/v). Kao standard za usporedbu koristili smo 100 mM Trolox. Idućih 90 minuta svaku minutu mjerili smo fluorescenciju na spektrofotometru pri uvjetima:  $\lambda_{\text{eksc}} = 485 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ .

Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata klica izračunali smo koristeći sljedeću formulu:

$$ORAC \left( \mu M \frac{ET}{g} \right) = \frac{C_{Trolox} * (AUC_{uzorak} - AUC_{kontrola}) * k}{AUC_{trolox} - AUC_{uzorak}}$$

$$AUC = 1 + \sum \left( \frac{f_n}{f_{0'}} \right)$$

i izrazili u  $\mu M$  ekvivalenta Troloxa po gramu suhe mase

pri čemu je:

ET = ekvivalent Troloxa

$C_{Trolox}$  = koncentracija Troloxa

AUC = eng. *Area Under the Curve*, površina ispod krivulje

K = faktor razrijeđenja

$f_n$  = fluorescencija u  $n$  sekundi

$f_{0'}$  = fluorescencija na početku

## 2.15. Statistička analiza podataka

Dobivene podatke statistički smo obradili u programu Statistica 13.1 (Stat Soft Inc., SAD). Uzgoj klica, tretmani i svaki tip analiza ponovljeni su tri puta. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti triju bioloških replika (i unutar svake tri tehničke replike)  $\pm$  standardna greška. Usporedbu uzoraka proveli smo pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) te primjenom testa "Duncan's New Multiple Range Test" (DNMRT), tj. *post hoc* testa višestrukih usporedbi. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Metodu analize glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) upotrijebili smo



za vizualizaciju odnosa između fitokemijskog sastava, antioksidacijskog kapaciteta, te stupnja inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze i testiranih skupina klica. Sve podatke prije ove analize standardizirali smo kako bismo ih sveli na usporedive vrijednosti. Metodu hijerarhijskog klasteriranja (eng. *Hierarchical Clustering*, HC) proveli smo s ciljem grupiranja skupina klica na temelju izmjerenih parametara i vizualizacije njihove sličnosti/različitosti. Pearsonove koeficijente korelacije između pojedinih parametara izračunali smo kako bismo dobili uvid u njihove međusobne odnose.

Napomena: U opisima rezultata i diskusiji promjene vrijednosti manje ili jednake 1 izražavali smo postotcima (%), a promjene veće od 1 izražavali smo cijelim brojem.

### 3. REZULTATI

### 3.1. Utjecaj elicitora na fenotip klica rotkvice

Nakon 72 sata tretmana elicitorima, klice tretirane natrijevim kloridom bile su zelenije i veće od kontrolne skupine (Slika 4). Također, tretmani natrijevim kloridom rezultirali su boljim fenotipom klica od kontrolne i grupa tretiranih saharozom ili salicilnom kiselinom. Tretmani saharozom i salicilnom kiselinom rezultirali su manjom biomasom klica u odnosu na kontrolne biljke. Najmanja biomasa primijećena je nakon tretmana salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL.

Kontrola



NaCl 0,1 mg/mL



NaCl 1 mg/mL



NaCl 10 mg/mL



Sah 0,1 mg/mL



Sah 1 mg/mL



Sah 10 mg/mL



SA 0,01 mg/mL



SA 0,1 mg/mL



SA 0,5 mg/mL

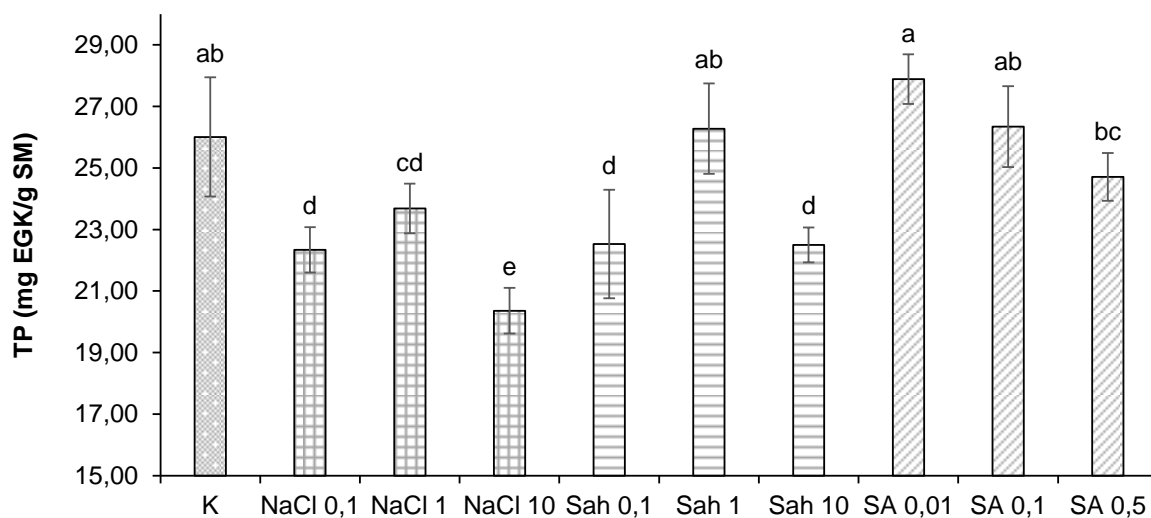


**Slika 4.** Fenotip kontrolnih i klica rotkvice tretiranih različitim koncentracijama natrijeva klorida, saharoze ili salicilne kiseline. NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina.

## 3.2. Utjecaj elicitora na fitokemijski sastav klica rotkvice

### 3.2.1. Utjecaj elicitora na udio ukupnih fenola u klicama rotkvice

Najveći udio ukupnih fenolnih spojeva zabilježili smo s iznosom od 27,89 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase u klicama tretiranim najnižom koncentracijom salicilne kiseline, 0,01 mg/mL (Slika 5), međutim na razini  $p \leq 0,05$  to nije bila statistički značajna promjena u odnosu na kontrolnu skupinu u kojoj smo zabilježili 26,01 ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase. Povećanjem koncentracije salicilne kiseline, udio fenolnih spojeva u klicama rotkvice pokazivao je tendenciju smanjivanja. Do statistički značajnog smanjenja udjela ukupnih fenola, u odnosu na kontrolnu grupu, došlo je nakon tretmana svim trima koncentracijama natrijeva klorida, te tretmanom najvišom i najnižom koncentracijom saharoze, dok saharoza koncentracije 1 mg/mL nije promijenila udio ukupnih fenola u klicama. Najniži udio ukupnih fenola zabilježili smo u klicama tretiranim najvećom koncentracijom natrijeva klorida i iznosio je 20,36 mg EGK/g SM.

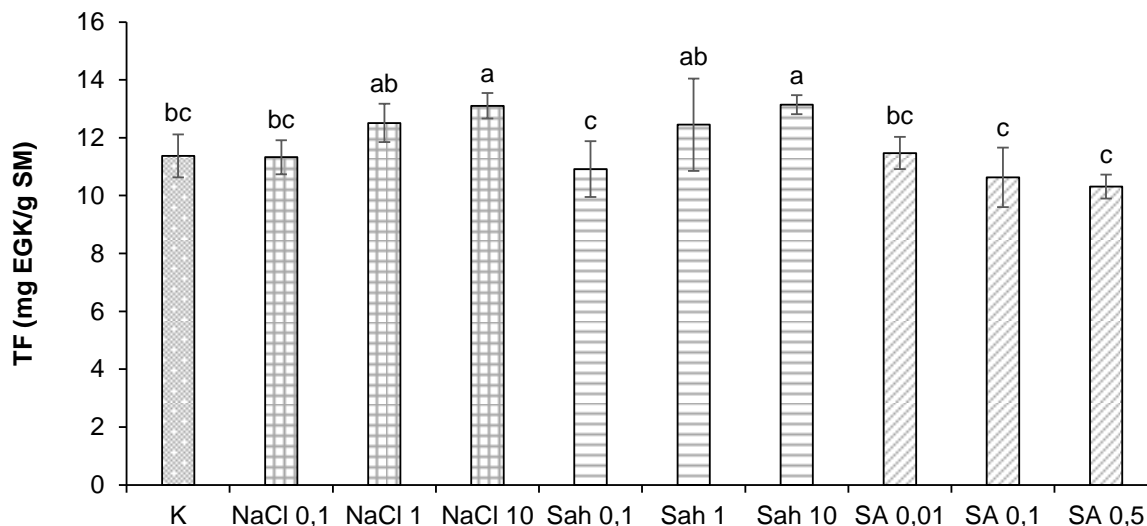


**Slika 5.** Utjecaj elicitora na udio ukupnih fenola u klicama rotkvice izražen u miligramima ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase (mg EGK/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). TP =

ukupni fenoli (*total phenolics*, TP), K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.2. Utjecaj elicitora na udio ukupnih flavonoida u klicama rotkvice

Netretirane klice rotkvice (kontrolna grupa) sadržavale su 11,37 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase (Slika 6). Značajan porast udjela ove grupe spojeva u klicama rotkvice zabilježili smo nakon tretmana najvišom koncentracijom, a to je 10 mg/mL, natrijeva klorida i saharoze. Ova dva tretmana ujedno su i jedini statistički značajno promijenili udio ukupnih flavonoida u klicama rotkvice. Zanimljivo, oba su ova elicitora s povišenjem koncentracije pokazala tendenciju povećanja udjela flavonoida, dok je u slučaju tretmana salicilnom kiselinom upravo obrnuto, najnižu vrijednost (10,31 mg EGK/g SM) zabilježili smo nakon tretmana najmanjom koncentracijom salicilne kiseline.

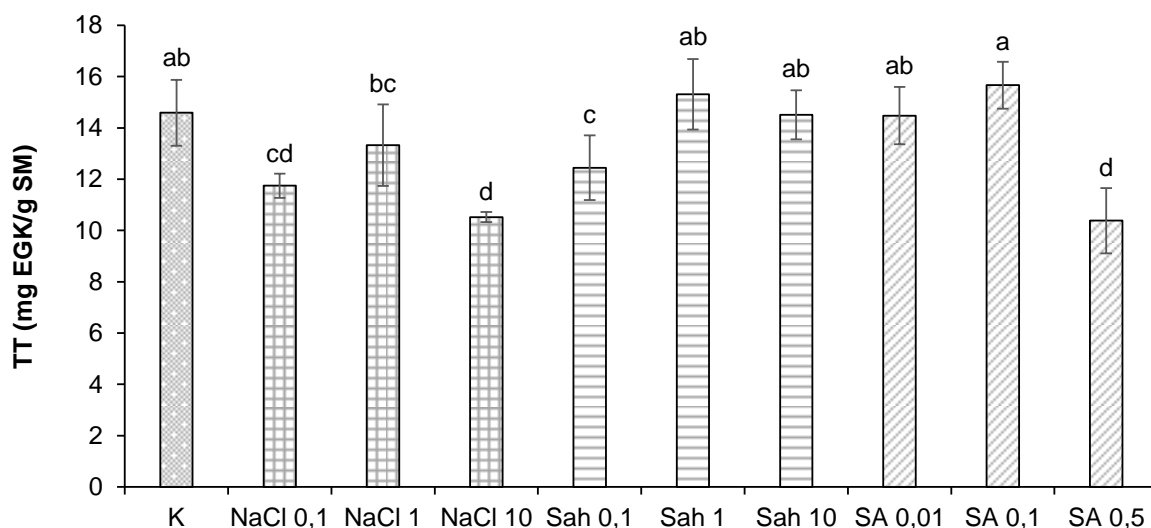


**Slika 6.** Utjecaj elicitora na udio ukupnih flavonoida u klicama rotkvice izražen u miligramima ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase (mg EGK/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). TF = ukupni flavonoidi (*total flavonoids*, TF), K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.3. Utjecaj elicitora na udio ukupnih tanina u klicama rotkvice

Najveći udio ukupnih tanina u klicama rotkvice zabilježili smo nakon tretmana salicilnom kiselinom koncentracije 0,1 mg/mL, iznosio je 15,66 mg EGK/g SM, međutim taj udio nije se značajno razlikovao od onog u kontrolne grupe (Slika 7).

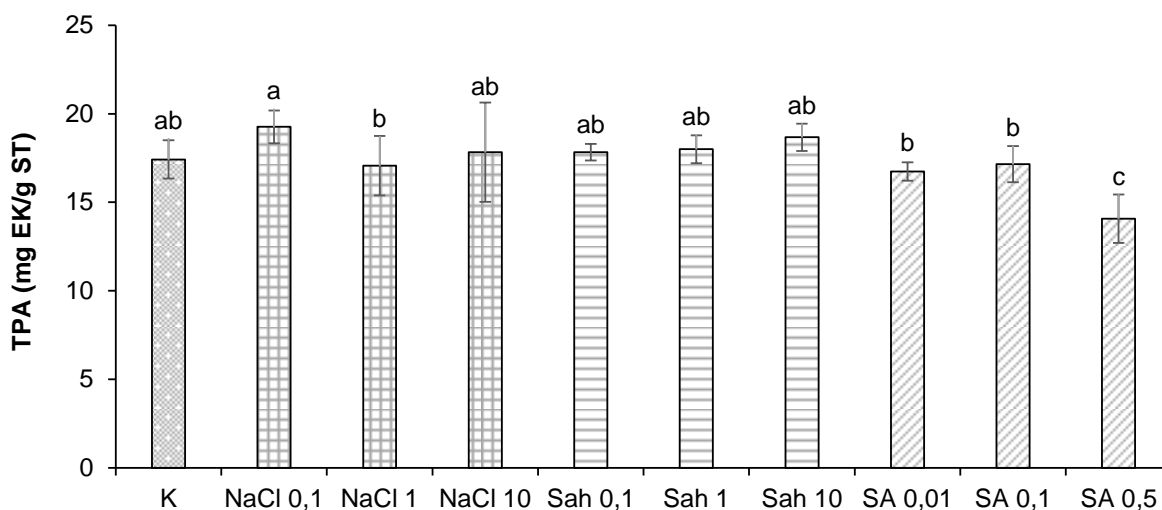
Statistički značajno smanjenje količine tanina u odnosu na kontrolne biljke uočili smo nakon primjene najniže i najviše koncentracije natrijeva klorida, te najniže koncentracije saharoze i najviše koncentracije salicilne kiseline. Najznačajniji pad udjela tanina u klicama rotkvice iznosio je 27,91% i 28,87% i to, redom, upotrebom natrijeva klorida koncentracije 10 mg/mL i salicilne kiseline koncentracije 0,5 mg/mL.



**Slika 7.** Utjecaj elicitora na udio ukupnih tanina u klicama rotkvice izražen u miligramima ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase (mg EGK/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). TT = ukupni tanini (*total tannins*, TT), K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.4. Utjecaj elicitora na udio ukupnih proantocijanidina u klicama rotkvice

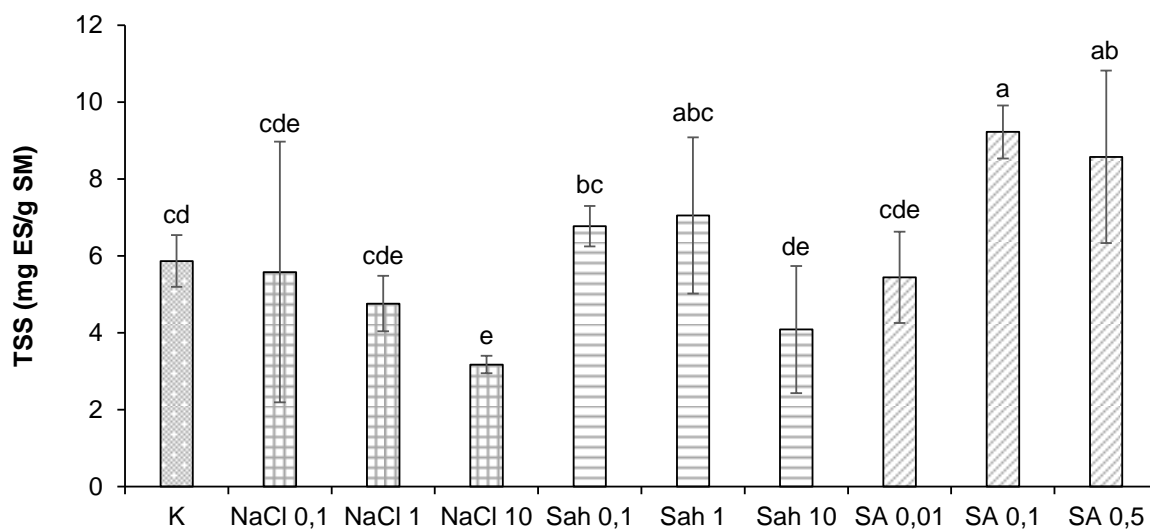
Najveći udio ukupnih proantocijanidina zabilježili smo s iznosom od 19,26 mg ekvivalenata katehina po gramu suhe mase u klicama tretiranim najnižom koncentracijom natrijeva klorida, 0,01 mg/mL (Slika 8), međutim to nije bilo statistički značajno povećanje u odnosu na netretirane klice (kontrolna grupa). Jedina statistički značajna promjena dogodila se pri tretmanu najvećom koncentracijom salicilne kiseline, 0,5 mg/mL, pri čemu smo zabilježili udio proantocijanidina od 14,08 mg EK/g SM, ujedno i najnižu vrijednost svih tretmana.



**Slika 8.** Utjecaj elicitora na udio ukupnih proantocijanidina u klicama rotkvice izražen u miligramima ekvivalenata katehina po gramu suhe mase (mg EK/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). TPA = ukupni proantocijanidini (*total proanthocyanidins*, TPA), K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.5. Utjecaj elicitora na udio ukupnih topivih šećera u klicama rotkvice

U netretiranim klicama rotkvice zabilježili smo 5,86 mg ekvivalenata saharoze po gramu suhe mase (Slika 9). Najveći porast udjela topivih šećera izmjerili smo nakon tretmana klica salicilnom kiselinom koncentracije 0,1 mg/mL, vrijednost je bila 9,22 mg ekvivalenata saharoze po gramu suhe mase, što je povećanje za 1,57 puta. Salicilna kiselina koncentracije 0,5 mg/mL također je uzrokovala značajan porast udjela topivih šećera u klicama rotkvice, zabilježili smo 8,57 mg/mL ekvivalenata saharoze po gramu suhe mase. Najniži udio ukupnih topivih šećera zabilježili smo u klicama tretiranim najvećom koncentracijom natrijeva klorida (1 mg/mL), iznosio je 3,17 mg ekvivalenata saharoze po gramu suhe mase, i taj tretman ujedno predstavlja jedini kojim je došlo do značajnog smanjenja količine šećera u klicama. Tretmani saharozom nisu značajno utjecali na udio ukupnih topivih šećera u klicama.

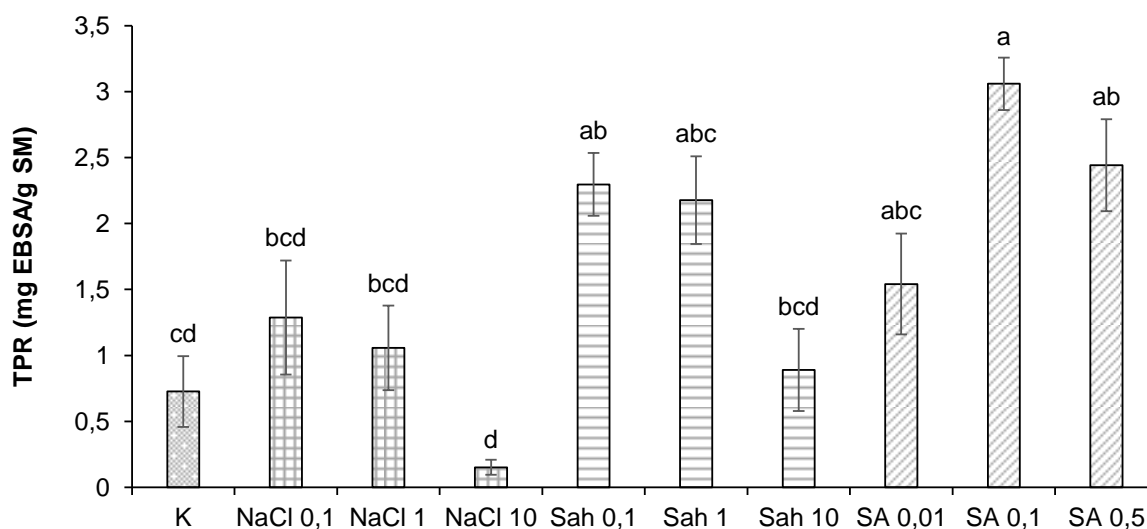


**Slika 9.** Utjecaj elicitora na udio ukupnih topivih šećera u klicama rotkvice izražen u miligramima ekvivalenata saharoze po gramu suhe mase (mg ES/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). TSS = ukupni topivi šećeri (*total soluble sugars*, TSS), K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.



### 3.2.6. Utjecaj elicitora na udio ukupnih proteina u klicama rotkvice

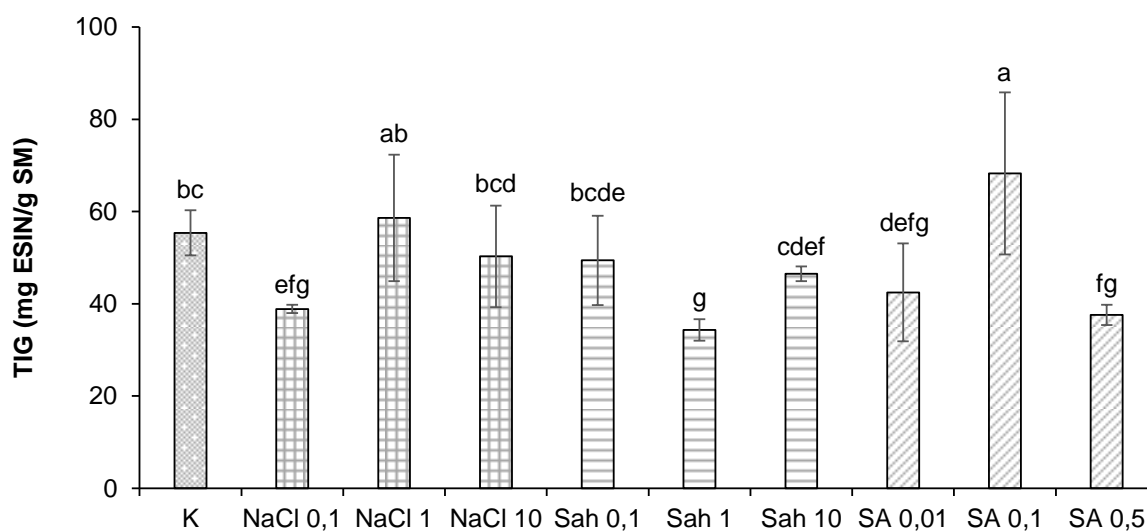
Udio ukupnih proteina u klicama rotkvice iznosio je 0,73 mg ekvivalenata goveđeg albumina seruma po gramu suhe mase (Slika 10). Tretmani saharozom koncentracije 0,1 mg/mL, te salicilnom kiselinom koncentracija 0,1 mg/mL i 0,5 mg/mL značajno su povećali udio ukupnih proteina u klicama. Najveći udio ukupnih proteina zabilježili smo s iznosom od 3,06 mg ekvivalenata goveđeg albumina seruma po gramu suhe mase u klicama tretiranim salicilnom kiselinom koncentracije 0,1 mg/mL, što predstavlja povećanje količine proteina za čak 4,19 puta. Generalno, svi tretmani elicitorima rezultirali su tendencijom povećanja udjela ukupnih proteina u odnosu na netretirane klice, osim tretmana najvišom koncentracijom (10 mg/mL) natrijeva klorida koji je doveo do statistički značajnog smanjenja udjela ukupnih proteina.



**Slika 10.** Utjecaj elicitora na udio ukupnih proteina u klicama rotkvice izražen u miligramima ekvivalenata goveđeg albumina seruma po gramu suhe mase (mg EBSA/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). TP = ukupni proteini (*total proteins*, TP), K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.7. Utjecaj elicitora na udio ukupnih intaktnih glukozinolata u klicama rotkvice

Najveći udio intaktnih glukozinolata zabilježili smo s iznosom od 68,25 miligrama ekvivalenta sinigrina po gramu suhe mase u klicama tretiranim salicilnom kiselinom koncentracije 0,1 mg/mL, i to je značajan porast od 23,26% u odnosu na kontrolnu grupu koja je sadržavala 55,37 mg/g suhe mase (Slika 11). Tretman natrijevim kloridom srednje vrijednosti koncentracije (1 mg/mL) pokazao je trend povećanja vrijednosti u odnosu na kontrolnu grupu, dok su tretmani saharozom pokazali obrnuti trend te je srednja koncentracija saharoze rezultirala najnižom vrijednosti ukupnih glukozinolata u klicama i iznosila 34,33 mg ESIN/g SM. Natrijev klorid koncentracije 0,1 mg/mL, saharoza 1 mg/mL i salicilna kiselina koncentracija 0,01 mg/mL i 0,5 mg/mL značajno su smanjili količinu ukupnih glukozinolata u klicama rotkvice.



**Slika 11.** Utjecaj elicitora na udio ukupnih intaktnih glukozinolata u klicama rotkvice izražen u miligramima ekvivalenta sinigrina po gramu suhe mase (mg ESIN/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). TIG = ukupni intaktni glukozinolati (*total intact glucosinolates*, TIG), K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.8. Utjecaj elicitora na udio fotosintetskih pigmenata u klicama rotkvice

U kontrolnoj skupini klica zabilježili smo količinu ukupnih klorofila u iznosu od 25,82 mg/g SM, od čega 19,10 mg/g SM klorofila *a* i 6,72 mg/g SM klorofila *b* (Tablica 3). Karotenoida je bilo 5,81 mg/g SM, od čega  $\beta$ -karotena 0,31 mg/g SM, a likopena 0,88 mg/g SM (Tablica 4). Udio klorofila *a* i *b* (kao i ukupnih) značajno je porastao nakon tretmana natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL i to za 29,90%, dok se omjer klorofila *a* i *b* tim tretmanom značajno smanjio.

**Tablica 3.** Utjecaj elicitora na udio klorofila u klicama rotkvice izražen u miligramima po gramu suhe mase (mg/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite vrijednosti unutar iste kolone označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Klo *a* = klorofil *a*, Klo *b* = klorofil *b*, Klo = ukupni klorofili, K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

	<b>Klo <i>a</i></b>	<b>Klo <i>b</i></b>	<b>Klo</b>	<b>Klo <i>a/b</i></b>
<b>K</b>	19,10 $\pm$ 2,62 bc	6,72 $\pm$ 2,52 b	25,82 $\pm$ 5,14 bc	2,84 abc
<b>NaCl 0,1</b>	18,93 $\pm$ 1,19 bc	6,52 $\pm$ 1,40 b	25,45 $\pm$ 2,57 bc	2,90 abc
<b>NaCl 1</b>	22,51 $\pm$ 1,98 a	11,02 $\pm$ 2,16 a	33,54 $\pm$ 4,02 a	2,04 d
<b>NaCl 10</b>	17,70 $\pm$ 2,18 bc	7,29 $\pm$ 2,60 b	24,99 $\pm$ 4,77 bc	2,43 cd
<b>Sah 0,1</b>	17,49 $\pm$ 2,22 bc	6,28 $\pm$ 0,81 b	23,77 $\pm$ 3,03 bc	2,79 bc
<b>Sah 1</b>	19,53 $\pm$ 1,00 b	6,94 $\pm$ 1,72 b	26,48 $\pm$ 2,71 bc	2,81 abc
<b>Sah 10</b>	16,66 $\pm$ 0,73 c	5,47 $\pm$ 0,51 b	22,13 $\pm$ 1,24 c	3,05 abc
<b>SA 0,01</b>	19,86 $\pm$ 2,46 b	7,71 $\pm$ 1,16 b	27,57 $\pm$ 3,62 b	2,58 cd
<b>SA 0,1</b>	19,34 $\pm$ 1,36 b	5,86 $\pm$ 0,53 b	25,20 $\pm$ 0,82 bc	3,30 ab
<b>SA 0,5</b>	17,49 $\pm$ 0,51 bc	4,90 $\pm$ 0,31 b	22,39 $\pm$ 0,79 c	3,57 a

Količina ukupnih karotenoida nije se značajno promijenila nakon niti jednog od primijenjenih tretmana, dok je natrijev klorid koncentracije 1 mg/mL značajno smanjio količinu  $\beta$ -karotena, a povećao količinu likopena (Tablica 4).

**Tablica 4.** Utjecaj elicitora na udio karotenoida u klicama rotkvice izražen u miligramima po gramu suhe mase (mg/g SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite vrijednosti unutar iste kolone označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Kar = ukupni karotenoidi, K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

	<b>Kar</b>	<b><math>\beta</math>-karoten</b>	<b>Likopen</b>
<b>K</b>	5,81 $\pm$ 0,78 abc	0,31 $\pm$ 0,04 a	0,88 $\pm$ 0,16 bcd
<b>NaCl 0,1</b>	5,78 $\pm$ 0,23 abc	0,31 $\pm$ 0,04 a	0,87 $\pm$ 0,06 bcd
<b>NaCl 1</b>	6,30 $\pm$ 0,30 a	0,21 $\pm$ 0,10 b	1,09 $\pm$ 0,06 a
<b>NaCl 10</b>	6,13 $\pm$ 0,18 ab	0,33 $\pm$ 0,06 a	0,94 $\pm$ 0,13 bc
<b>Sah 0,1</b>	5,55 $\pm$ 0,35 c	0,31 $\pm$ 0,01 a	0,84 $\pm$ 0,07 bcd
<b>Sah 1</b>	6,13 $\pm$ 0,43 ab	0,33 $\pm$ 0,03 a	0,92 $\pm$ 0,10 bcd
<b>Sah 10</b>	5,43 $\pm$ 0,04 c	0,34 $\pm$ 0,01 a	0,82 $\pm$ 0,03 cd
<b>SA 0,01</b>	6,11 $\pm$ 0,21 ab	0,32 $\pm$ 0,03 a	0,96 $\pm$ 0,07 b
<b>SA 0,1</b>	6,08 $\pm$ 0,14 ab	0,37 $\pm$ 0,02 a	0,89 $\pm$ 0,03 bcd
<b>SA 0,5</b>	5,65 $\pm$ 0,45 bc	0,36 $\pm$ 0,02 a	0,80 $\pm$ 0,04 d

Ukupni fotosintetski pigmenti (klorofili i karotenoidi) značajno su porasli nakon tretmana natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL (Tablica 5). Udio klorofila u ukupnim fotosintetskim pigmentima kontrolnih klica rotkvice iznosio je 81%, a karotenoida 19%. Tretman natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL značajno je smanjio udio karotenoida u

ukupnim pigmentima, dok ostali tretmani nisu imali značajan utjecaj. Omjer klorofila i karotenoida u kontrolnoj skupini klica iznosio je 4,41 i značajno je porastao (na 5,35) pod utjecajem natrijeva klorida koncentracije 1 mg/mL.

**Tablica 5.** Utjecaj elicitora na ukupne klorofile i karotenoide (izražene u miligramima po gramu suhe mase (mg/g SM)), te njihove omjere u klicama rotkvice. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite vrijednosti unutar iste kolone označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Klo *a* = klorofil *a*, Klo *b* = klorofil *b*, Kar = ukupni karotenoide, K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

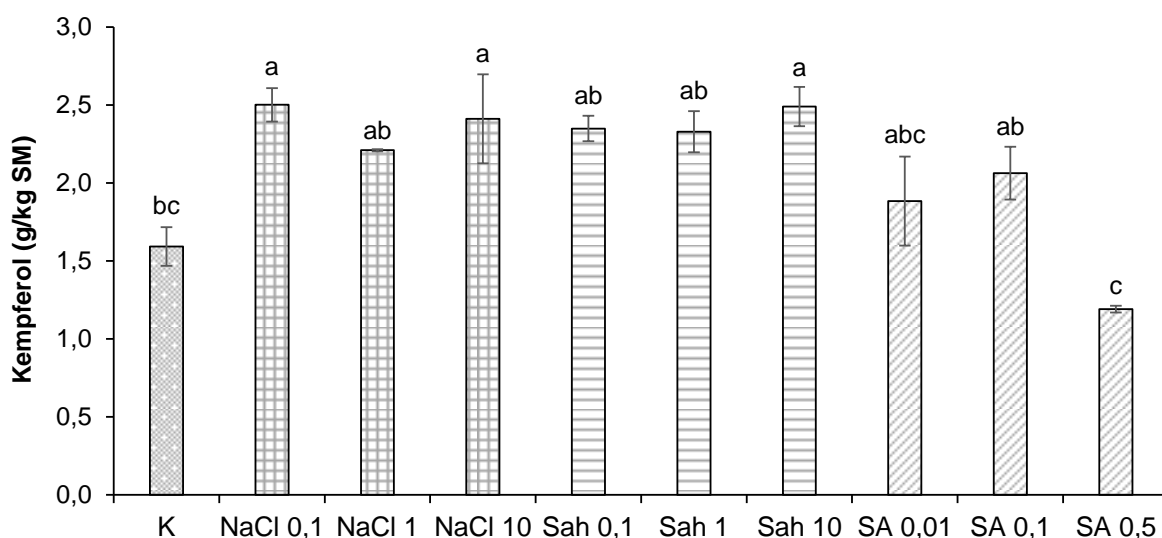
	<b>Klo + Kar</b>	<b>Klo / (Klo + Kar)</b>	<b>Kar / (Klo + Kar)</b>	<b>Klo / Kar</b>
<b>K</b>	31,63 $\pm$ 5,92 bc	0,81 $\pm$ 0,01 b	0,19 $\pm$ 0,01 a	4,41 $\pm$ 0,30 b
<b>NaCl 0,1</b>	31,23 $\pm$ 2,80 bc	0,81 $\pm$ 0,00 b	0,19 $\pm$ 0,01 a	4,40 $\pm$ 0,28 b
<b>NaCl 1</b>	39,84 $\pm$ 3,93 a	0,84 $\pm$ 0,02 b	0,16 $\pm$ 0,02 b	5,35 $\pm$ 0,79 a
<b>NaCl 10</b>	31,12 $\pm$ 4,93 bc	0,80 $\pm$ 0,03 b	0,20 $\pm$ 0,03 a	4,06 $\pm$ 0,68 b
<b>Sah 0,1</b>	29,32 $\pm$ 3,38 bc	0,81 $\pm$ 0,01 b	0,19 $\pm$ 0,01 a	4,27 $\pm$ 0,28 b
<b>Sah 1</b>	32,61 $\pm$ 3,13 bc	0,81 $\pm$ 0,01 b	0,19 $\pm$ 0,01 a	4,31 $\pm$ 0,15 b
<b>Sah 10</b>	27,56 $\pm$ 1,22 c	0,80 $\pm$ 0,01 b	0,20 $\pm$ 0,01 a	4,07 $\pm$ 0,24 b
<b>SA 0,01</b>	33,67 $\pm$ 3,82 b	0,82 $\pm$ 0,01 b	0,18 $\pm$ 0,01 a	4,50 $\pm$ 0,45 b
<b>SA 0,1</b>	31,28 $\pm$ 0,96 bc	0,81 $\pm$ 0,00 b	0,19 $\pm$ 0,00 a	4,15 $\pm$ 0,05 b
<b>SA 0,5</b>	28,04 $\pm$ 1,24 c	0,80 $\pm$ 0,00 b	0,20 $\pm$ 0,01 a	3,98 $\pm$ 0,18 b

### 3.2.9. Utjecaj elicitora na koncentraciju pojedinačnih fenolnih spojeva i *L*-askorbinske kiseline u klicama rotkvice

#### 3.2.9.1. Utjecaj elicitora na koncentraciju kempferola u klicama rotkvice

U hidroliziranom ekstraktu kontrolnog uzorka klica rotkvice zabilježili smo 1,59 g kempferola po kilogramu suhe mase (Slika 12). Iako su tretmani svim trima primijenjenim koncentracijama natrijeva klorida i saharoze rezultirali povećanjem koncentracije kempferola u klicama, statistički značajne promjene na razini  $p \leq 0,05$  pripisali smo tretmanima natrijevim kloridom koncentracija 0,1 i 10 mg/mL, te saharozom koncentracije 10 mg/mL, redom za 57%, 52% i 57% u odnosu na kontrolnu grupu. Tretmani nižim koncentracijama salicilne kiseline (0,01 mg/mL i 0,1 mg/mL) također su pokazali tendenciju povećanja koncentracije kempferola i to za otprilike 30% u odnosu na kontrolnu grupu, iako to na razini  $p \leq 0,05$  nije bilo značajno, dok je tretman salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL pokazao trend smanjenja udjela kempferola u klicama.

U nehidroliziranom ekstraktu udio kempferola bio je ispod razine detekcije u svim uzorcima, stoga graf ne prikazujemo.

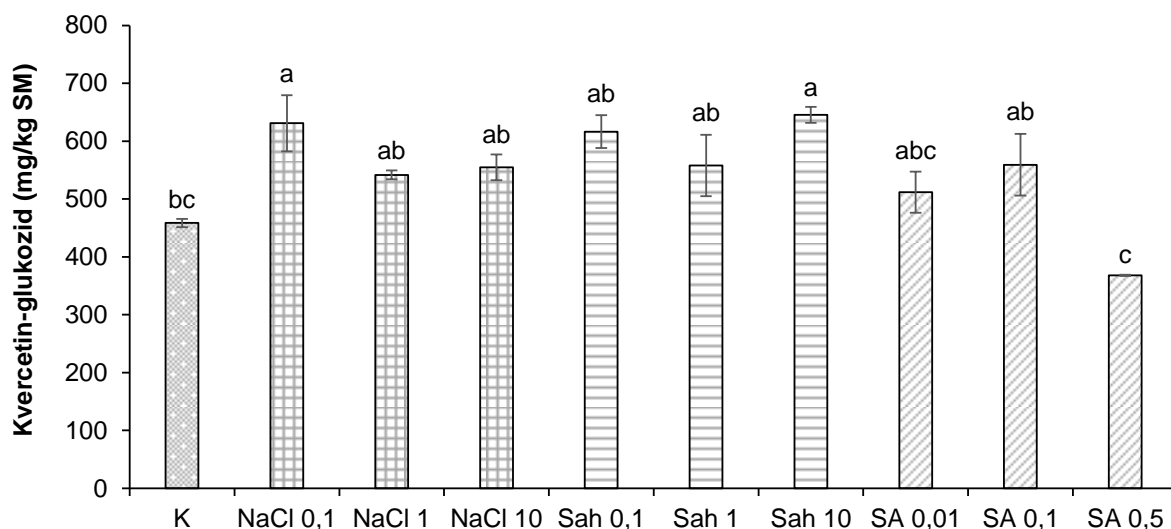


**Slika 12.** Utjecaj elicitora na udio kempferola u hidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u gramima po kilogramu suhe mase (g/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.9.2. Utjecaj elicitora na koncentraciju kempferol-glukozida u klicama rotkvice

U nehidroliziranom ekstraktu kontrolnog uzorka klica rotkvice zabilježili smo 639,30 mg kempferol-glukozida po kilogramu suhe mase (Slika 13). Tretmani natrijevim-kloridom koncentracije 1 mg/mL i 10 mg/mL doveli su do povećanja udjela kempferol-glukozida od 37% u odnosu na netretirane klice, no na razini  $p \leq 0,05$  to nije bilo značajno. Štoviše, to su jedina dva tretmana koja su pokazala trend porasta udjela kempferol-glukozida u klicama, svi ostali rezultirali su trendom snižavanja. Dok smo povećanjem koncentracije natrijeva klorida primijetili tendenciju porasta udjela kempferol-glukozida u klicama, u slučaju salicilne kiseline trend je bio obrnut – povećanjem koncentracije salicilne kiseline, udio kempferol-glukozida u klicama se smanjivao. Tretmani saharozom rezultirali su najmanjim promjenama u udjelu kempferol-glukozida.

Nakon hidrolize udio kempferol-glukozida bio je ispod razine detekcije u svim uzorcima pa graf nismo ni prikazali.

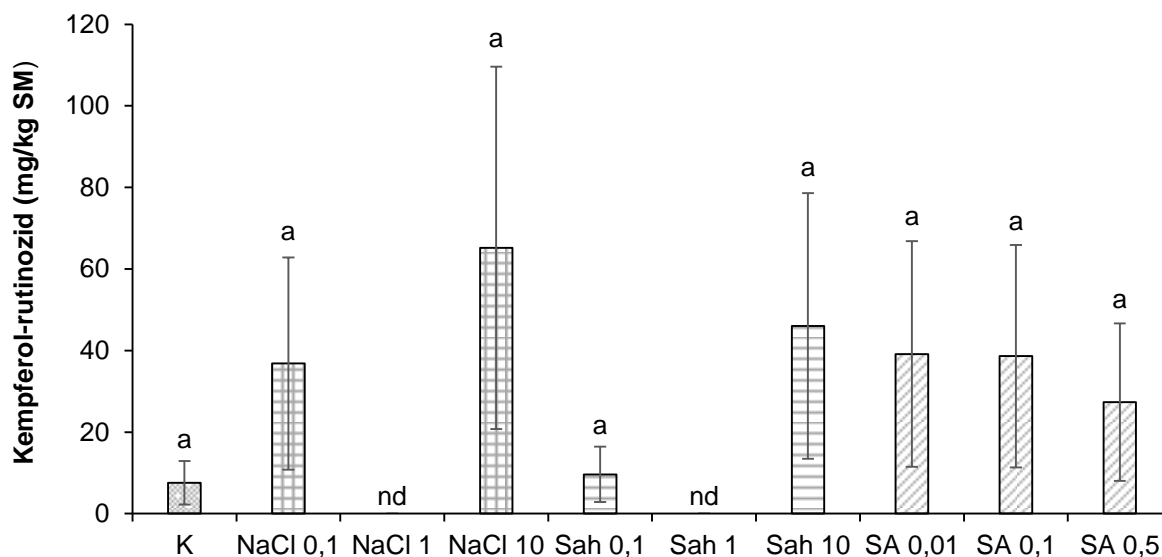


**Slika 13.** Utjecaj elicitora na udio kempferol-glukozida u nehidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u miligramima po kilogramu suhe mase (g/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.9.3. Utjecaj elicitora na udio kempferol-rutinozida u klicama rotkvice

Kempferol-rutinozid zabilježili smo samo u nehidroliziranim ekstraktima (Slika 14) i to s jako izraženim standardnim greškama. Iako su razlike u udjelu ovog spoja među skupinama klica očite, zbog velikih standardnih grešaka nisu bile značajne ( $p \leq 0,05$ ). U dvije skupine klica ovaj je spoj čak bio ispod razine detekcije (tretmani natrijevim-kloridom i saharozom, oba koncentracije 1 mg/mL).



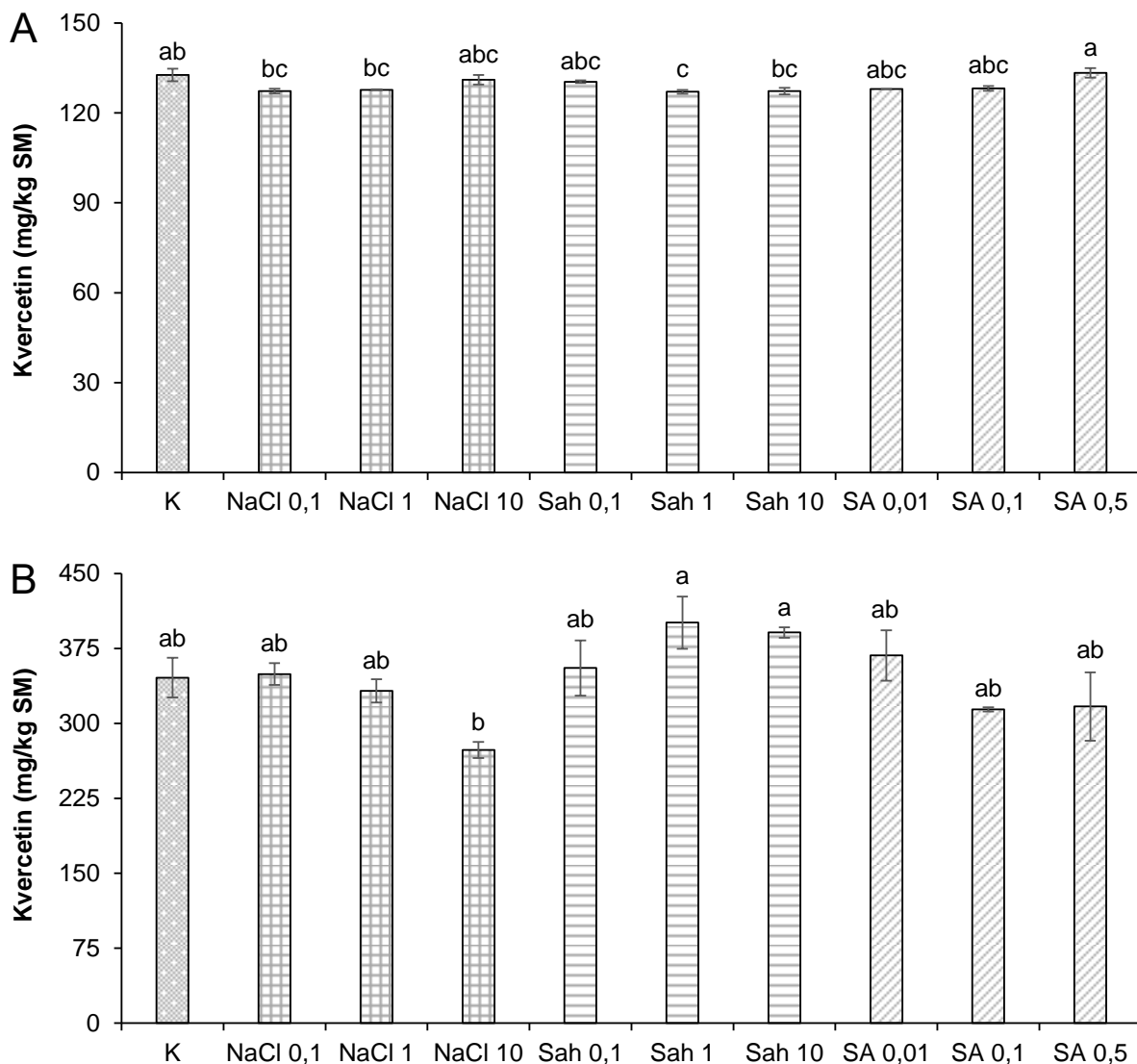


**Slika 14.** Utjecaj elicitora na udio kempferol-rutinozida u nehidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u miligramima po kilogramu suhe mase (mg/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina, nd = nije detektiran (ispod razine detekcije). 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

#### 3.2.9.4. Utjecaj elicitora na koncentraciju kvercetina u klicama rotkvice

U nehidroliziranom ekstraktu kontrolnih klica rotkvice izmjerili smo 132,65 mg kvercetina po kilogramu suhe mase (Slika 15 A). Značajnu promjenu udjela ovog spoja zabilježili smo nakon tretmana saharozom koncentracije 1 mg/mL, smanjio se. Ostali tretmani nisu značajno utjecali na količinu kvercetina u nehidroliziranim ekstraktima klica.

U hidroliziranim ekstraktima (Slika 15 B) zabilježili smo 2,61 puta veće koncentracije kvercetina nego u nehidroliziranim. Kontrolna je skupina sadržavala 345,76 mg kvercetina po kilogramu suhe mase, ostale skupine nisu se značajno razlikovale od kontrolne u količini ovog spoja. Primijetili smo obrnuto proporcionalan odnos udjela kvercetina u klicama i koncentracije natrijeva klorida kojima su klice bile tretirane, no na razini  $p \leq 0,05$  to nisu bile značajne promjene.



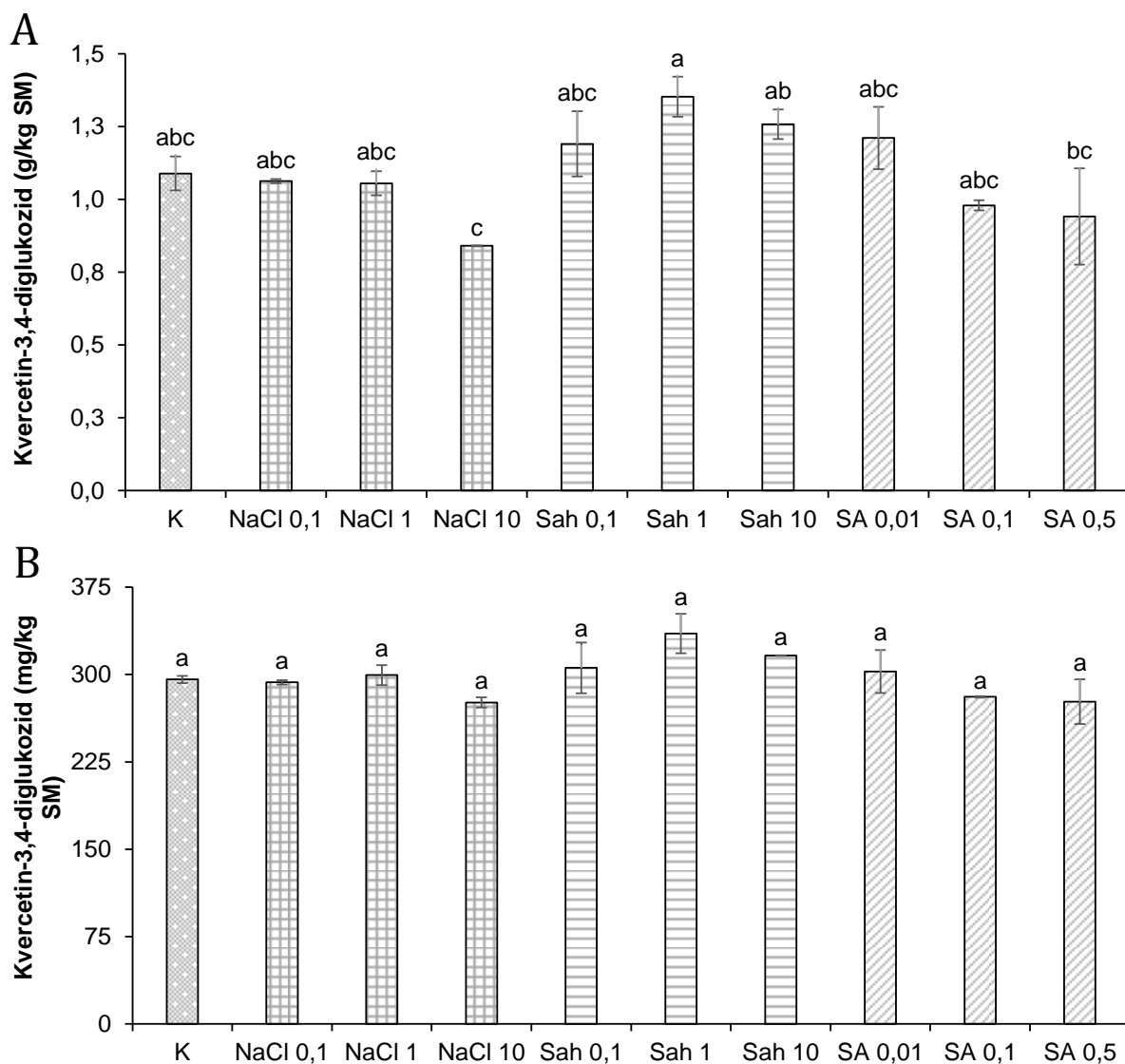
**Slika 15.** Utjecaj elicitora na udio kvercetina u A) nehidroliziranim i B) hidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u gramima po kilogramu suhe mase (g/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.9.5. Utjecaj elicitora na udio kvercetin-3,4-diglukozida u klicama rotkvice

U nehidroliziranom ekstraktu kontrolnih klica rotkvice zabilježili smo 1,09 g kvercetin-3,4-diglukozida po kilogramu suhe mase (Slika 16 A). Niti jedan od tretmana nije statistički značajno, na razini  $p \leq 0,05$ , promijenio udio ovog glikozida u klicama, iako smo nakon tretmana saharozom koncentracije 1 mg/mL primijetili trend povećanja količine ovog spoja (porasla je za 24%), a nakon tretmana natrijevim-kloridom koncentracije 10 mg/mL, trend smanjenja količine kvercetin-3,4-diglukozida.

U hidroliziranom ekstraktu (Slika 16 B) izmjerili smo 295,74 mg kvercetin-3,4-diglukozida po kilogramu suhe mase. Niti jedan od tretmana nije značajno, na razini  $p \leq 0,05$ , promijenio udio ovog glikozida u klicama. Tretman nakon kojega smo zabilježili najveći udio kvercetin-3,4-diglukozida u klicama bio je onaj saharozom koncentracije 1 mg/mL, međutim vrijednost se nije razlikovala značajno od vrijednosti ostalih skupina klica.

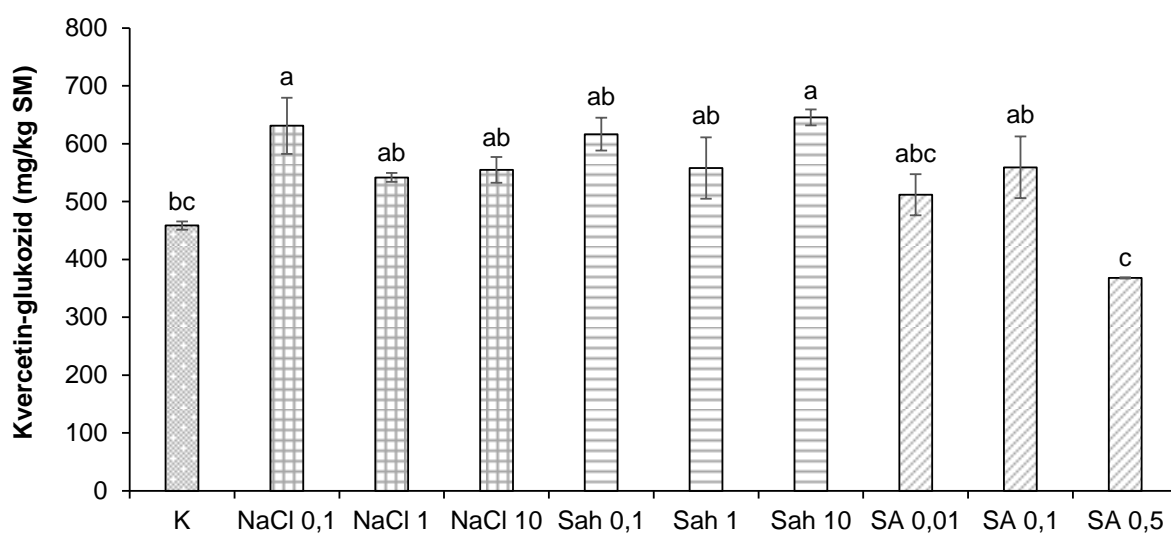
Veće promjene udjela kvercetin-3,4-diglukozida u klicama nakon pojedinog tretmana zabilježili smo u nehidroliziranim ekstraktima.



**Slika 16.** Utjecaj elicitora na udio kvrcetin-3,4-diglukozida u A) nehidroliziranim i B) hidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u gramima po kilogramu suhe mase (g/kg SM) i miligramima po kilogramu suhe mase (mg/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.9.6. Utjecaj elicitora na udio kvercetin-glukozida u klicama rotkvice

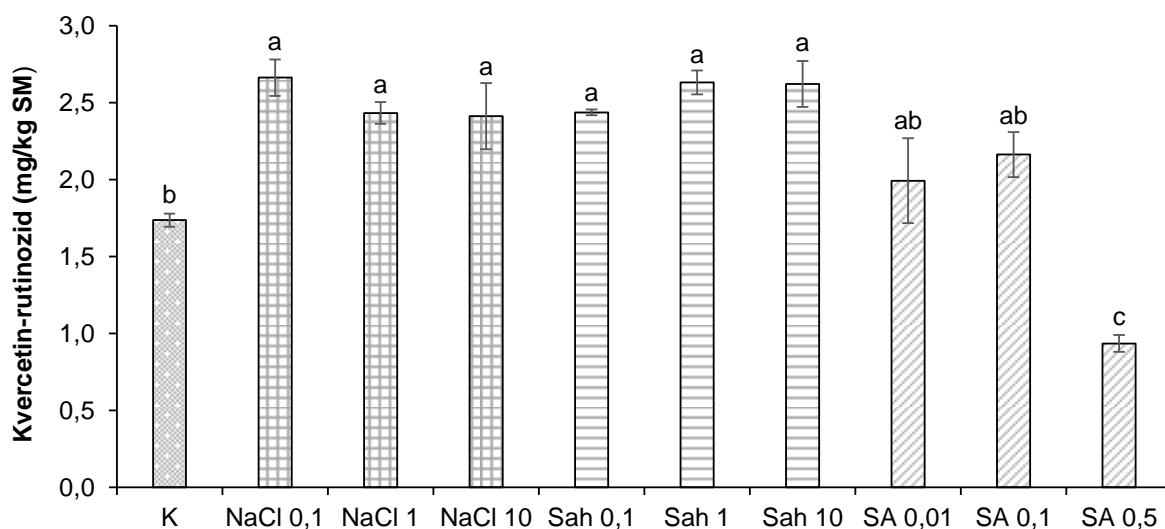
Kvercetin-glukozid zabilježili smo samo u nehidroliziranim ekstraktima. U kontrolnim uzorcima klica rotkvice izmjerili smo udio kvercetin-glukozida od 458,39 mg po kilogramu suhe mase (Slika 17). Do najvećih, i statistički značajnih, povećanja udjela ovog spoja došlo je nakon tretmana najvišom koncentracijom saharoze (10 mg/mL) te najnižom koncentracijom natrijeva klorida (0,1 mg/mL), redom povećanja od 40,75% i 37,63%. Ostali tretmani nisu značajno promijenili udio ovog spoja u klicama rotkvice.



**Slika 17.** Utjecaj elicitora na udio kvercetin-glukozida u nehidroliziranim klicama rotkvice izražen u miligramima po kilogramu suhe mase (mg/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.9.7. Utjecaj elicitora na udio kvercetin-rutinozida u klicama rotkvice

Kvercetin-rutinozid smo također zabilježili samo u nehidroliziranim ekstraktima. Kontrolna skupina klica sadržavala je 1,74 mg kvercetin-rutinozida po kilogramu suhe mase, a tretmani natrijevim kloridom i saharozom (sve tri koncentracije kod oba elicitora) značajno su povećali udio ovog spoja u klicama rotkvice (Slika 18). Niže koncentracije salicilne kiseline nisu značajno promijenile udio kvercetin-rutinozida u klicama, ali je zato najviša koncentracija (0,5 mg/mL) značajno smanjila udio ovog glikozida u klicama rotkvice.

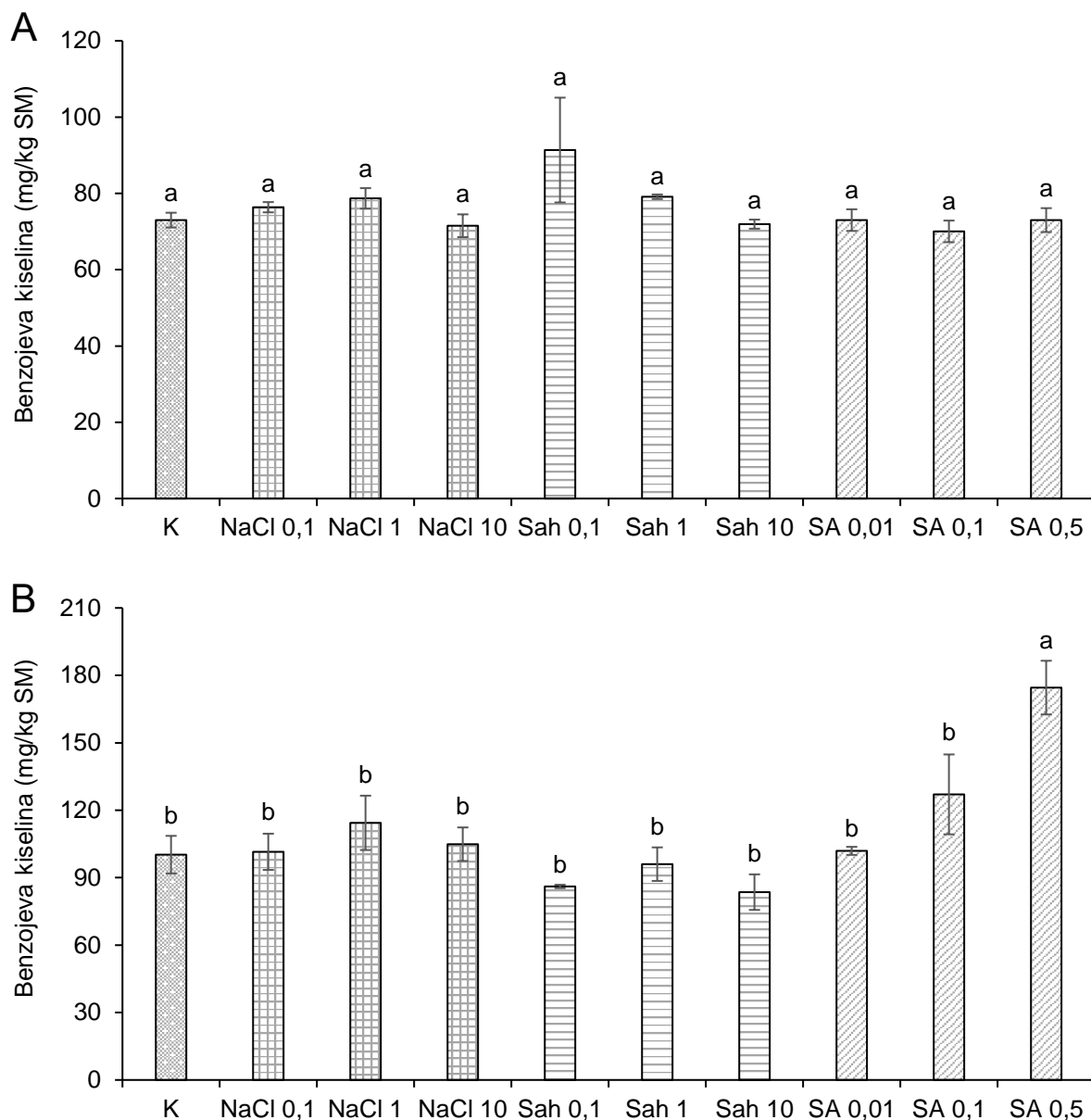


**Slika 18.** Utjecaj elicitora na udio kvercetin-rutinozida u nehidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u miligramima po kilogramu suhe mase (mg/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### **3.2.10. Utjecaj elicitora na koncentraciju pojedinačnih fenolnih kiselina u klicama rotkvice**

#### **3.2.10.1. Utjecaj elicitora na udio benzojeve kiseline u klicama rotkvice**

U nehidroliziranom kontrolnom uzorku klica rotkvice zabilježili smo 73,00 mg benzojeve kiseline po kilogramu suhe mase (Slika 19 A), a kod hidroliziranog kontrolnog uzorka 100,23 mg po kilogramu suhe mase (Slika 19 B). Nijedan od tretmana nije značajno promijenio udio benzojeve kiseline u nehidroliziranim ekstraktima. S druge strane, nakon hidrolize ekstrakata, zabilježili smo značajno povećanje udjela ove kiseline nakon tretmana najvećom koncentracijom (0,5 mg/mL) salicilne kiseline. Također, primijetili smo da je udio benzojeve kiseline u nehidroliziranim klicama proporcionalan koncentraciji salicilne kiseline koja je upotrijebljena kao elicitor, upotrebom salicilne kiseline od 0,5 mg/mL udio benzojeve kiseline u klicama se s početnih 73,00 mg po kilogramu suhe mase povećao na 174,54 mg po kilogramu suhe mase.

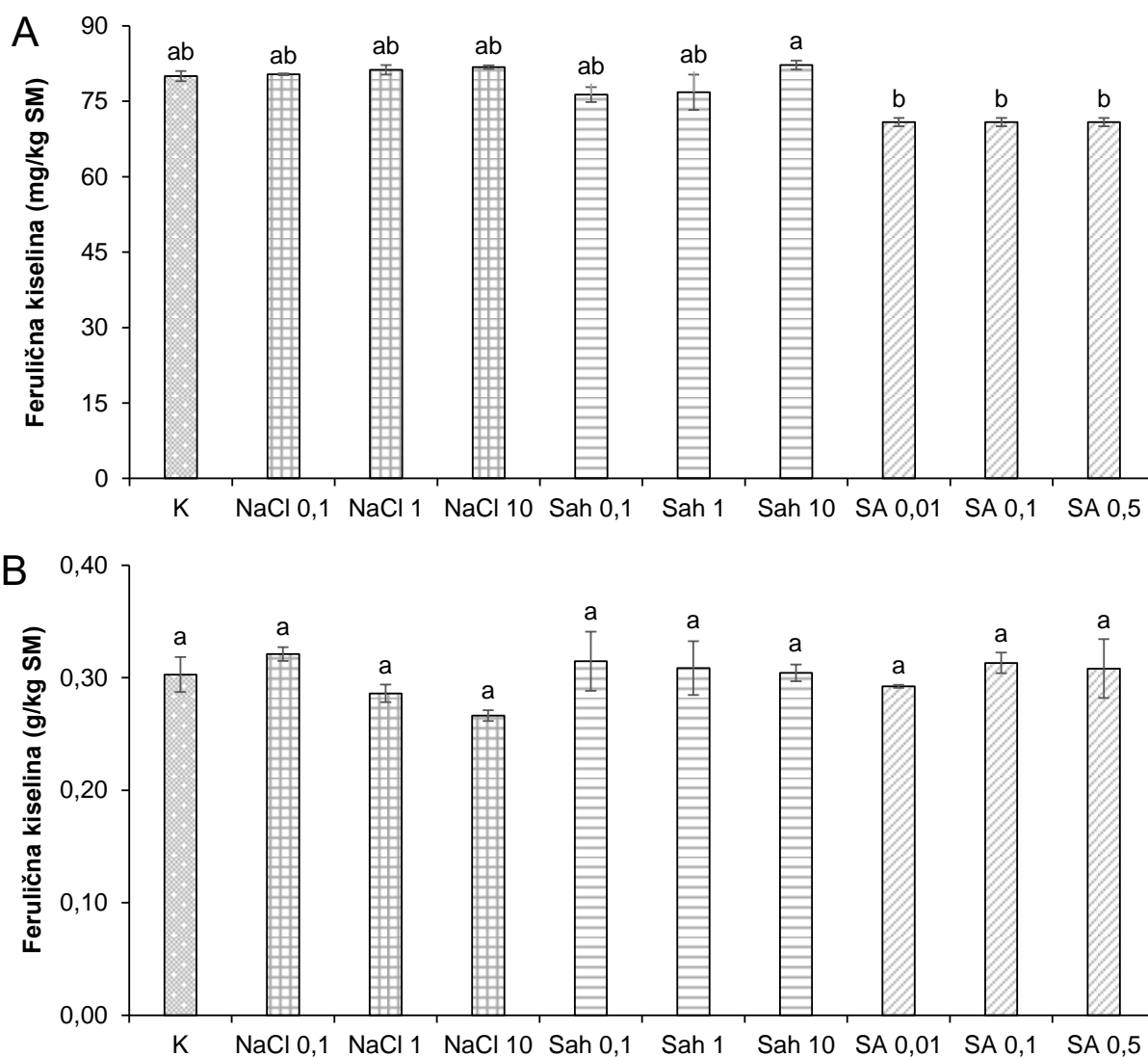


**Slika 19.** Utjecaj elicitora na udio benzojeve kiseline u A) nehidroliziranim i B) hidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u miligramima po kilogramu suhe mase (mg/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.



### 3.2.10.2. Utjecaj elicitora na udio ferulične kiseline u klicama rotkvice

Kao što je prikazano na Slici 20, veći udio ferulične kiseline zabilježili smo u hidroliziranim nego u nehidroliziranim ekstraktima. Ni u jednom tipu ekstrakta udio ferulične kiseline nije se značajno promijenio nakon bilo kojeg od tretmana elicitorima u odnosu na kontrolnu grupu. Primijetili smo da je udio ferulične kiseline u hidroliziranim ekstraktima klica rotkvice obrnuto proporcionalan koncentraciji natrijeva klorida primijenjenog kao elicitora, no promjene vrijednosti nisu bile statističke značajne na razini  $p \leq 0,05$ , već su samo upućivale na blagi trend.



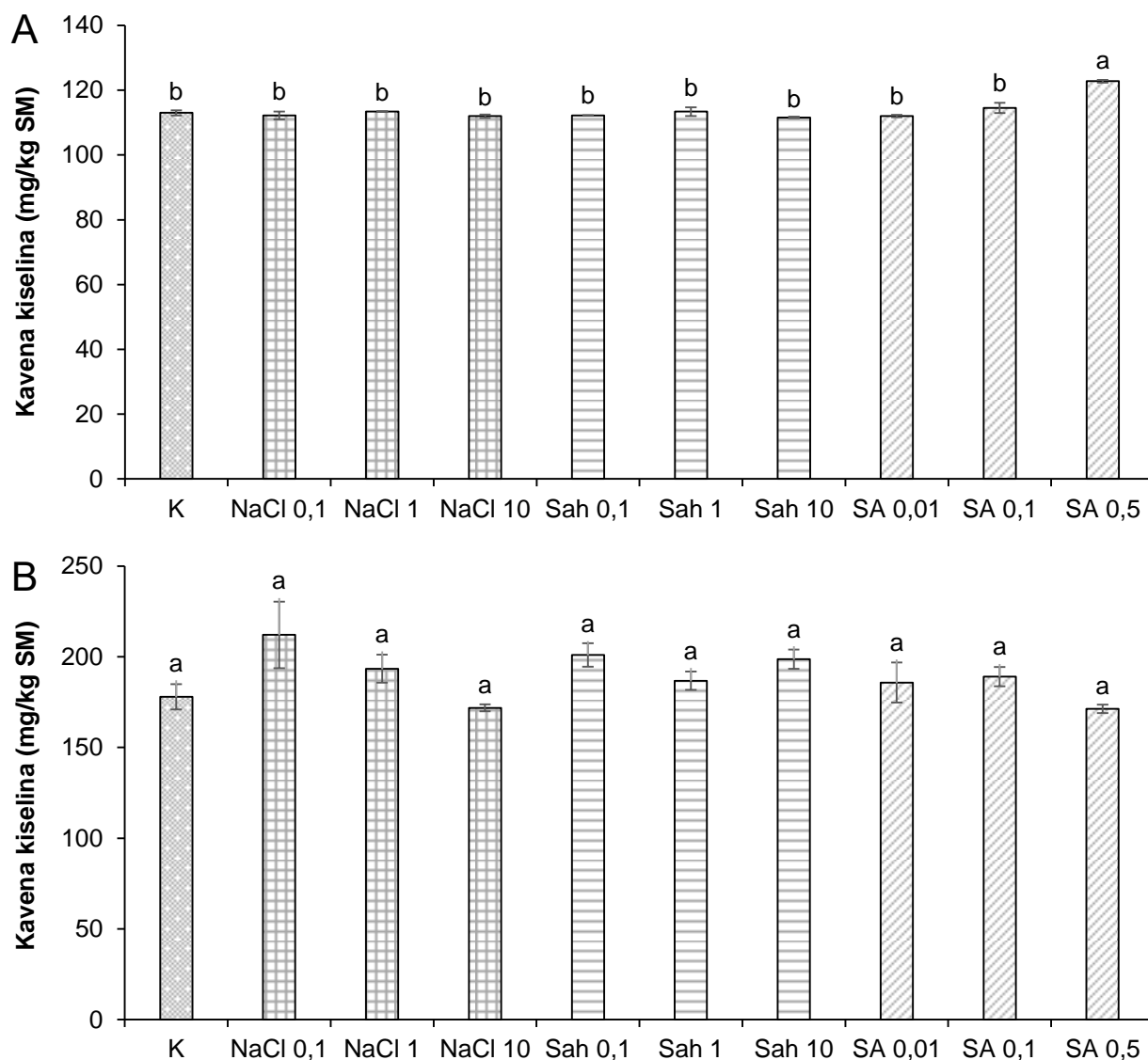
**Slika 20.** Utjecaj elicitora na udio ferulične kiseline u A) nehidroliziranim i B) hidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u miligramima po kilogramu suhe mase (mg/kg SM) i

gramima po kilogramu suhe mase (g/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### **3.2.10.3. Utjecaj elicitora na udio kavene kiseline u klicama rotkvice**

Udio kavene kiseline veći je u hidroliziranim nego nehidroliziranim ekstraktima (Slika 21 A i B), no razlike u vrijednostima nisu velike. U nehidroliziranom ekstraktu kontrolnih klica izmjerili smo 113,01 mg kavene kiseline po kilogramu suhe mase (Slika 21 A), a jedino značajno povećanje ovog udjela zabilježili smo nakon tretmana salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL. Ostali tretmani nisu promijenili udio kavene kiseline u klicama rotkvice.

Nakon hidrolize ekstrakata, u kontrolnim klicama izmjerili smo 178,01 mg kavene kiseline po kilogramu suhe mase (Slika 21 B). Tretmani elicitorima nisu znatno promijenili udio ovog spoja u klicama, međutim zapazili smo da je odnos udjela kavene kiseline u klicama i koncentracije primijenjenog natrijeva klorida obrnuto proporcionalan.

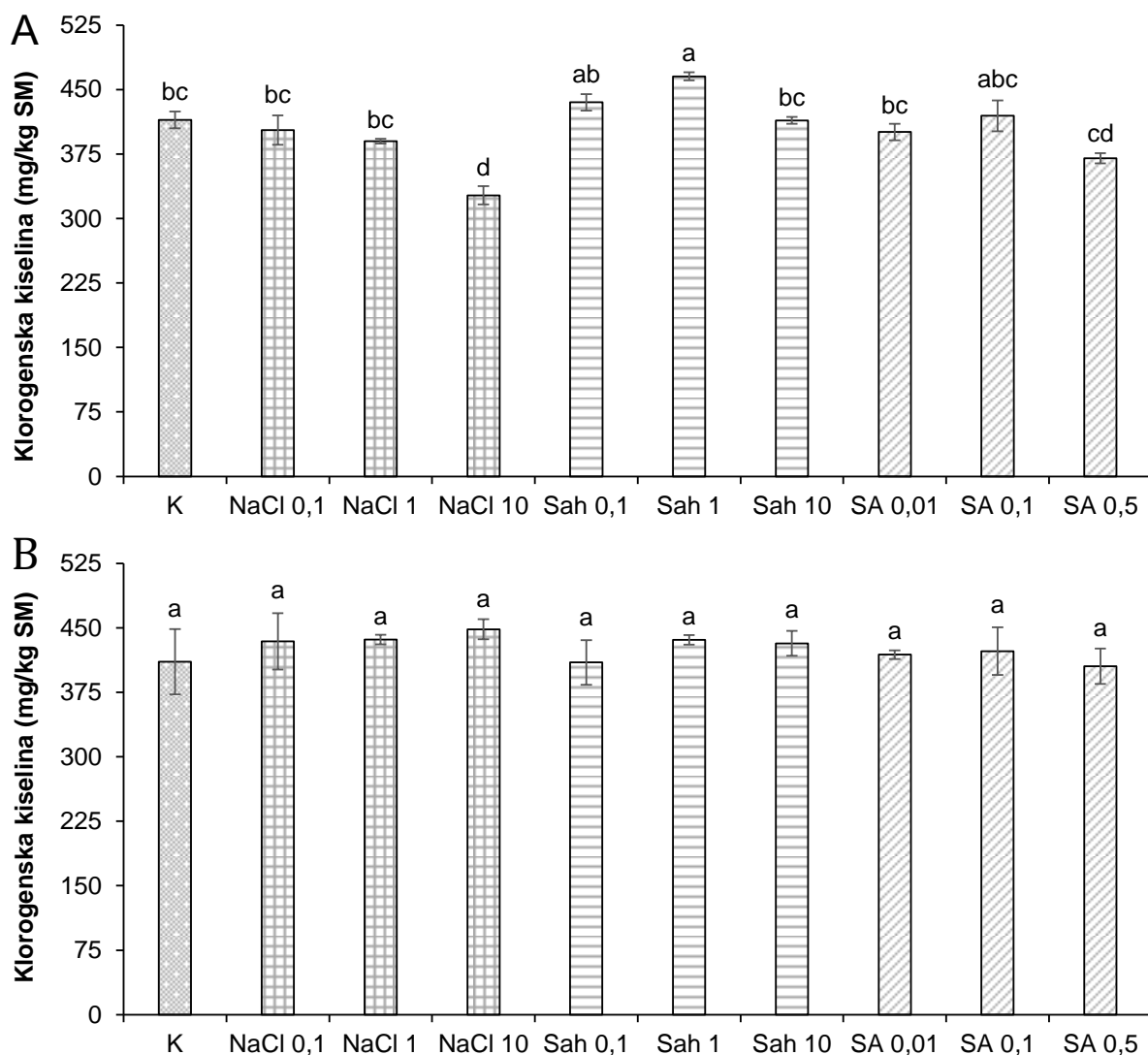


**Slika 21.** Utjecaj elicitora na udio kavene kiseline u A) nehidroliziranim i B) hidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u miligramima po kilogramu suhe mase (mg/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

#### **3.2.10.4. Utjecaj elicitora na udio klorogenske kiseline u klicama rotkvice**

Udjeli klorogenske kiseline u klicama rotkvice vrlo su slični u nehidroliziranim i hidroliziranim ekstraktima te iznose između 326,95 i 470,06 mg po kilogramu suhe mase (Slika 22). U nehidroliziranim uzorcima kontrolna skupina klica sadržavala je 414,59 mg klorogenske kiseline po kilogramu suhe mase i jedini tretman koji je značajno povećao tu vrijednost, na 465,4 mg po kilogramu suhe mase, bio je onaj saharozom koncentracije 1 mg/mL. Suprotno tome, jedini tretman koji je značajno smanjio udio klorogenske kiseline u klicama bio je onaj najvišom koncentracijom (10 mg/mL) natrijeva klorida. Ostali tretmani nisu značajno promijenili udio klorogenske kiseline u klicama. Primijetili smo da je udio klorogenske kiseline u klicama bio obrnuto proporcionalan koncentraciji primijenjenog natrijeva klorida kao elicitora (Slika 22 A).

Nakon hidrolize ekstrakata razlike u udjelima klorogenske kiseline između pojedinih su se skupina smanjile i više nisu bile značajne (Slika 22 B), no sve su vrijednosti ostale slične onima u nehidroliziranim ekstraktima.

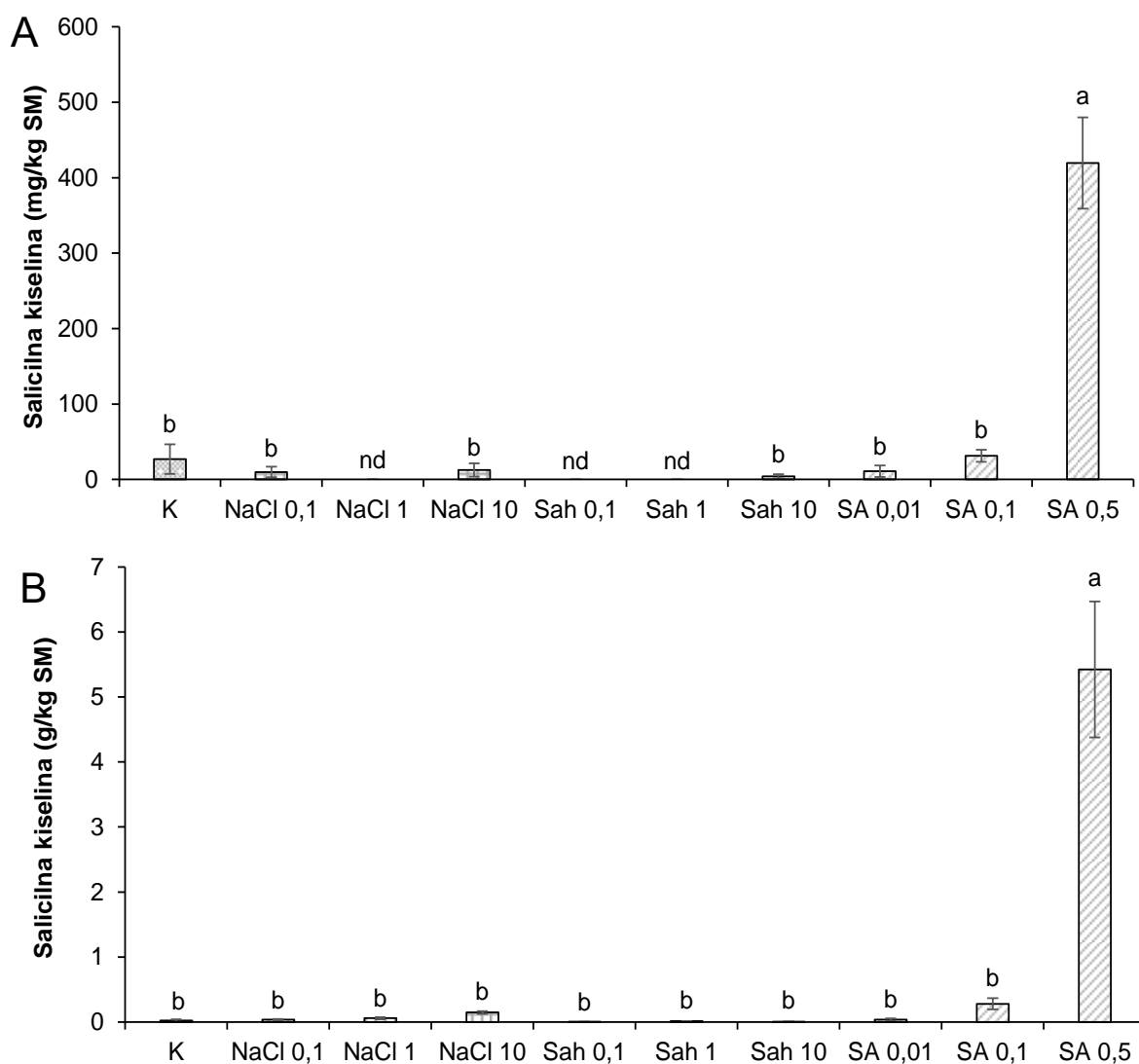


**Slika 22.** Utjecaj elicitora na udio klorogenske kiseline u A) nehidroliziranim i B) hidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u miligramima po kilogramu suhe mase (mg/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.10.5. Utjecaj elicitora na udio salicilne kiseline u klicama rotkvice

U nehidroliziranom kontrolnom uzorku klica rotkvice zabilježili smo 26,79 mg salicilne kiseline po kilogramu suhe mase (Slika 23 A), a nakon hidrolize uzoraka 23,82 mg po kilogramu (Slika 23 B), što je smanjenje za 11,09%. Tretmani natrijevim kloridom i saharozom

nisu značajno utjecali na udio salicilne kiseline u klicama. Jedini statistički značajan porast udjela ovog spoja u klicama, i kod nehidroliziranih i kod hidroliziranih uzoraka, zabilježili smo nakon tretmana salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL, i to redom 15,66 i 227,70 puta. Uz to, kod hidroliziranih uzoraka primijetili smo tendenciju rasta udjela salicilne kiseline u klicama s povećanjem koncentracije otopine natrijeva klorida kojom su klice tretirane (Slika 23 B).



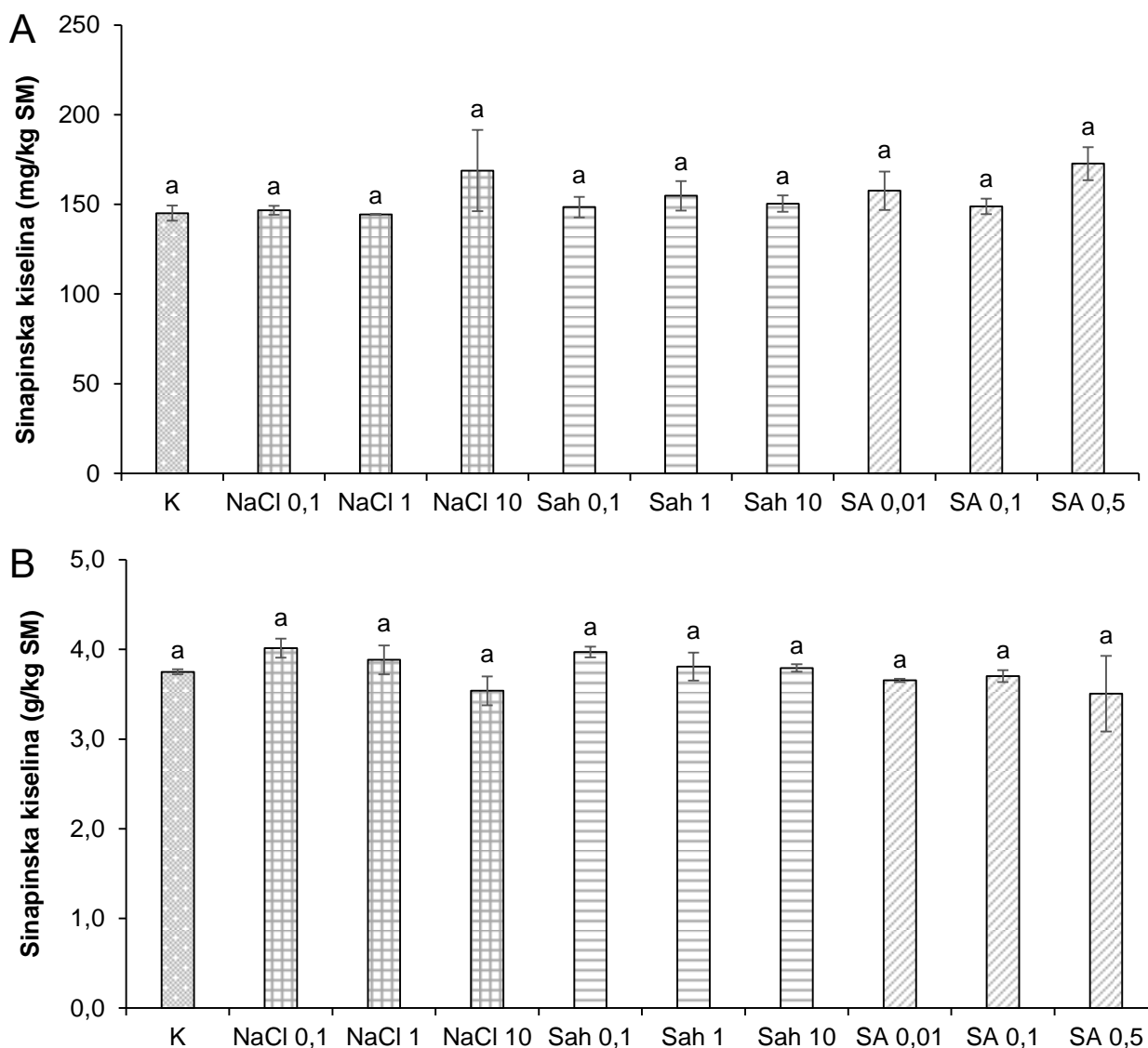
**Slika 23.** Utjecaj elicitora na udio salicilne kiseline u A) nehidroliziranim i B) hidroliziranim ekstraktima klica rotkvice izražen u miligramima po kilogramu suhe mase (mg/kg SM) i gramima po kilogramu suhe mase (g/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl =

natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.2.10.6. Utjecaj elicitora na udio sinapinske kiseline u klicama rotkvice

Primijenjeni elicitori nisu značajno promijenili udio sinapinske kiseline u klicama rotkvice (Slika 24 A i B). Udio ove kiseline znatno je veći u hidroliziranih nego nehidroliziranih uzoraka. U nehidroliziranom kontrolnom uzorku klica rotkvice zabilježili smo 145,10 mg sinapinske kiseline po kilogramu suhe mase, a kod hidroliziranih uzoraka 3,75 g po kilogramu, vrijednost veću 25,84 puta (Slika 24 A i B). Kod nehidroliziranih uzoraka najveći porast udjela sinapinske kiseline zabilježili smo nakon tretmana salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL, porast od 19,01% te natrijevim kloridom koncentracije 10 mg/mL, porast od 16,33% u odnosu na kontrolnu skupinu, međutim na razini  $p \leq 0,05$  to nisu značajne promjene.

Kod hidroliziranih uzoraka uočili smo negativnu korelaciju između primijenjene koncentracije otopine natrijeva klorida i udjela sinapinske kiseline u klicama. Zanimljivo, u dok smo u nehidroliziranim uzorcima zabilježili tendenciju porasta koncentracije sinapinske kiseline u klicama nakon tretmana najvišim koncentracijama otopina natrijeva klorida (10 mg/mL) i salicilne kiseline (0,5 mg/mL), nakon hidrolize ovi tretmani uzrokovali su tendenciju smanjivanja udjela sinapinske kiseline.



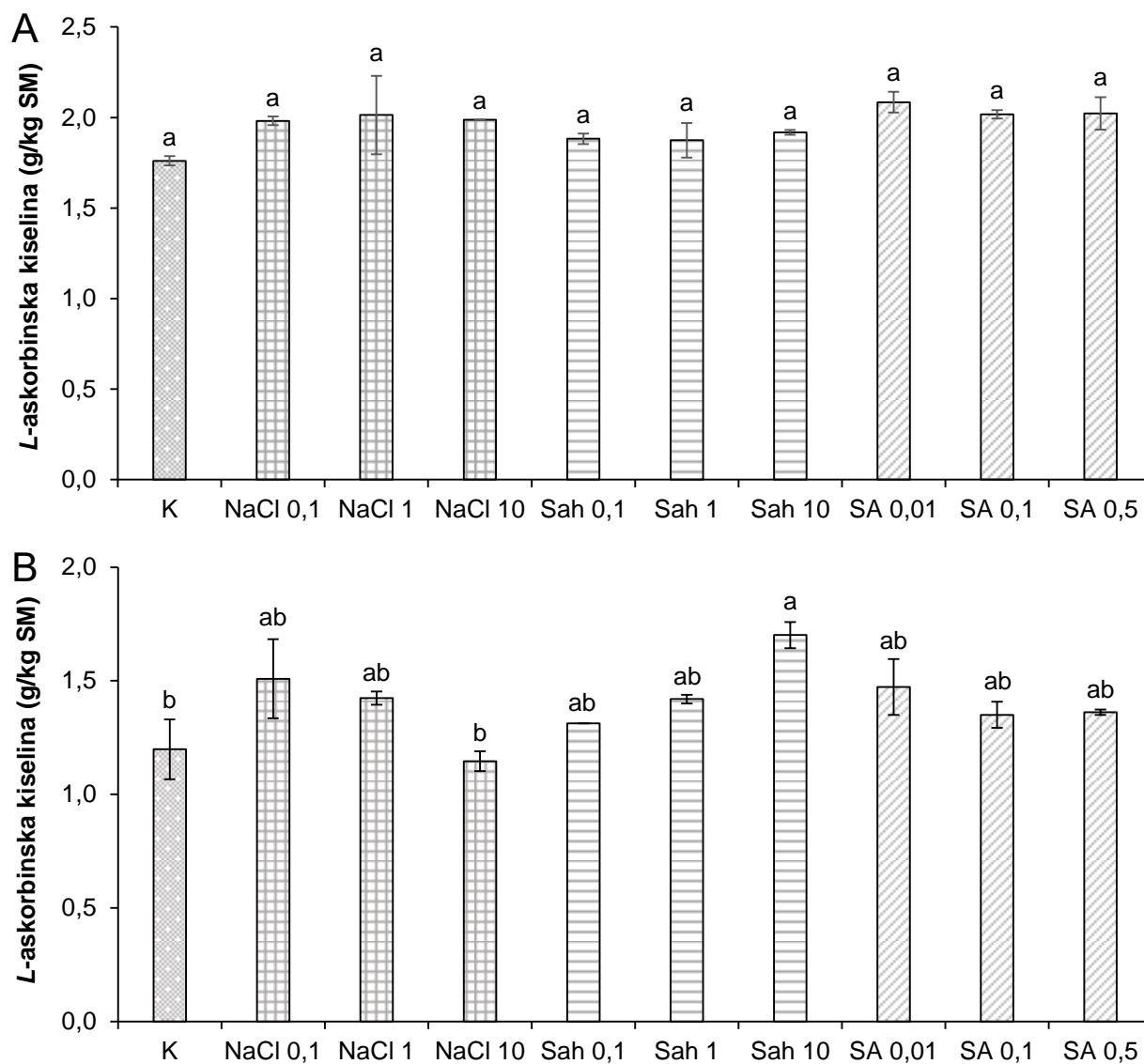
**Slika 24.** Utjecaj elicitora na udio sinapinske kiseline u A) nehidroliziranim i B) hidroliziranim klicama rotkvice izražen u miligramima po kilogramu suhe mase (mg/kg SM) i gramima po kilogramu suhe mase (g/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.



### 3.2.11. Utjecaj elicitora na koncentraciju *L*-askorbinske kiseline u klicama rotkvice

U nehidroliziranom kontrolnom uzorku klica rotkvice zabilježili smo 1,76 g *L*-askorbinske kiseline po kilogramu suhe mase, a kod hidroliziranih uzoraka 1,20 g po kilogramu, vrijednost manju za 31,82% (Slika 25 A i B). Kod nehidroliziranih uzoraka svi upotrebljeni tretmani elicitorima pokazali su tendenciju povećavanja udjela *L*-askorbinske kiseline u klicama, međutim na razini  $p \leq 0,05$  te promjene nisu bile statistički značajne (Slika 25 A). Najveći utjecaj zabilježili smo nakon tretmana salicilnom kiselinom koncentracije 0,01 mg/mL, u iznosu od 18,18% u odnosu na kontrolu. Tretman saharozom bio je najmanje učinkovit u tendenciji povećanja udjela *L*-askorbinske kiseline u klicama, dok su tretmani natrijevim kloridom i salicilnom kiselinom imali međusobno sličan učinak.

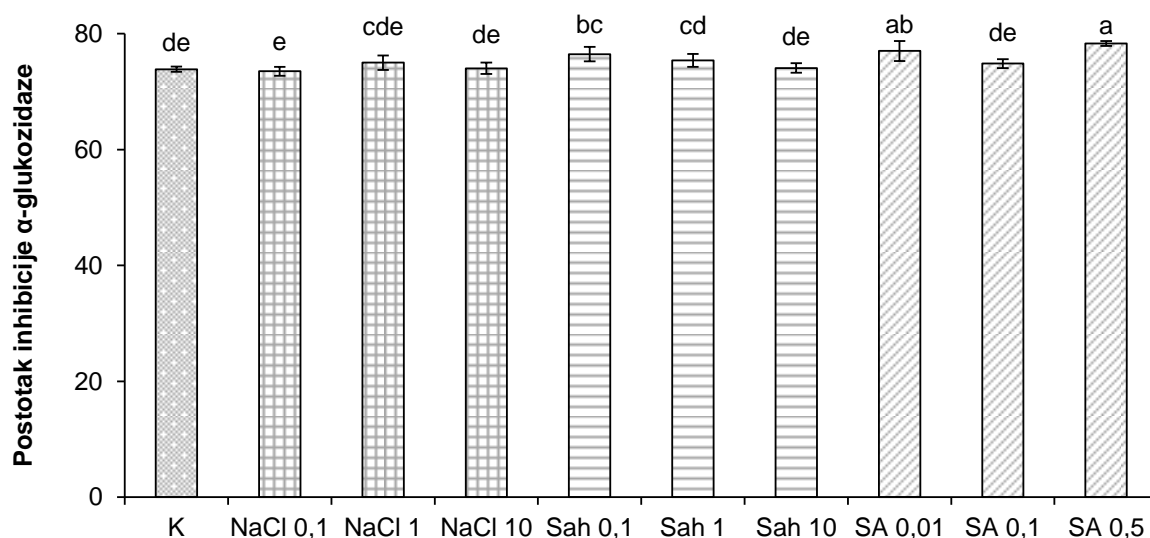
Nakon hidrolize uzoraka statistički značajno povećanje udjela *L*-askorbinske kiseline u klicama rotkvice zabilježili smo nakon tretmana najvišom koncentracijom natrijeva klorida (10 mg/mL) i to za 41,67% u odnosu na kontrolni uzorak (Slika 25 B). Ostali tretmani nisu značajno promijenili udio *L*-askorbinske kiseline u klicama. Zanimljivo, uočili smo suprotan učinak povećanja koncentracije otopine natrijeva klorida i saharoze. Naime, povećanje koncentracije saharoze pozitivno je utjecalo na udio *L*-askorbinske kiseline u klicama, dok za povećanje koncentracije natrijeva klorida vrijedi suprotna tendencija.



**Slika 25.** Utjecaj elicitora na udio *L*-askorbinske kiseline u A) nehidroliziranim i B) hidroliziranim klicama rotkvice izražen u gramima po kilogramu suhe mase (g/kg SM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.3. Utjecaj elicitora na potencijal klica rotkvice da inhibiraju enzim $\alpha$ -glukozidazu

Za kontrolnu grupu biljaka zabilježili smo stupanj inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze od 73,87% (Slika 26). Značajan porast potencijala inhibicije ovog enzima uočili smo kod klica koje smo tretirali saharozom koncentracije 0,1 mg/mL, te salicilnom kiselinom koncentracija 0,01 mg/mL i 0,5 mg/mL. Klice rotkvice tretirane salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL pokazale su najveći stupanj inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze, 78,30%. Nakon tretmana klica natrijevim kloridom, nismo primijetili značajne promjene u stupnju inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze u odnosu na kontrolne biljke.

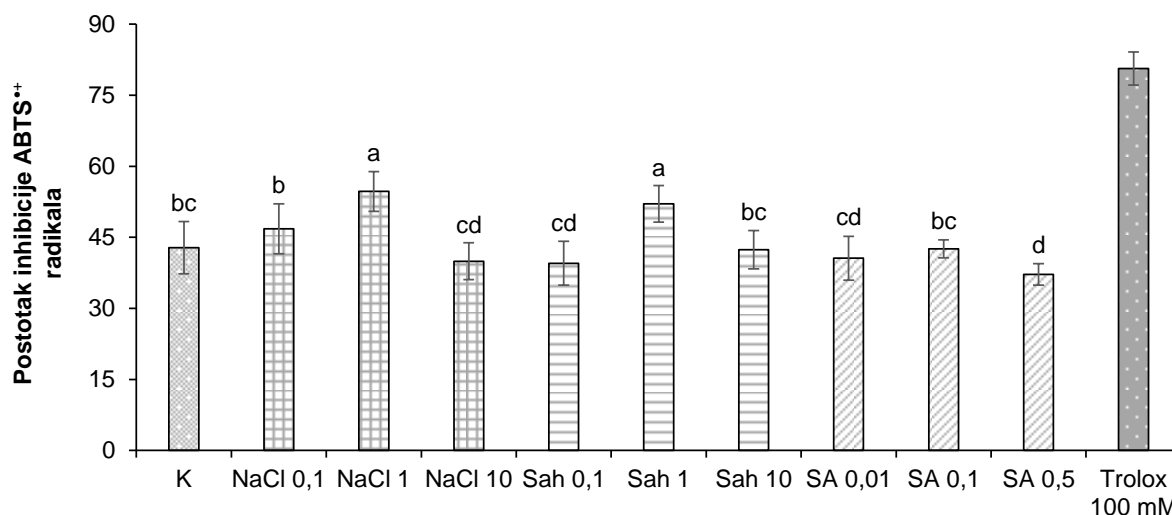


**Slika 26.** Utjecaj elicitora na potencijal klica rotkvice da inhibiraju aktivnost enzima  $\alpha$ -glukozidaze izražen u postotku inhibicije. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina, AK = akarboza. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.4. Utjecaj elicitora na antioksidacijski kapacitet klica rotkvice

#### 3.4.1. Utjecaj elicitora na antioksidacijski kapacitet klica rotkvice određen metodom ABTS

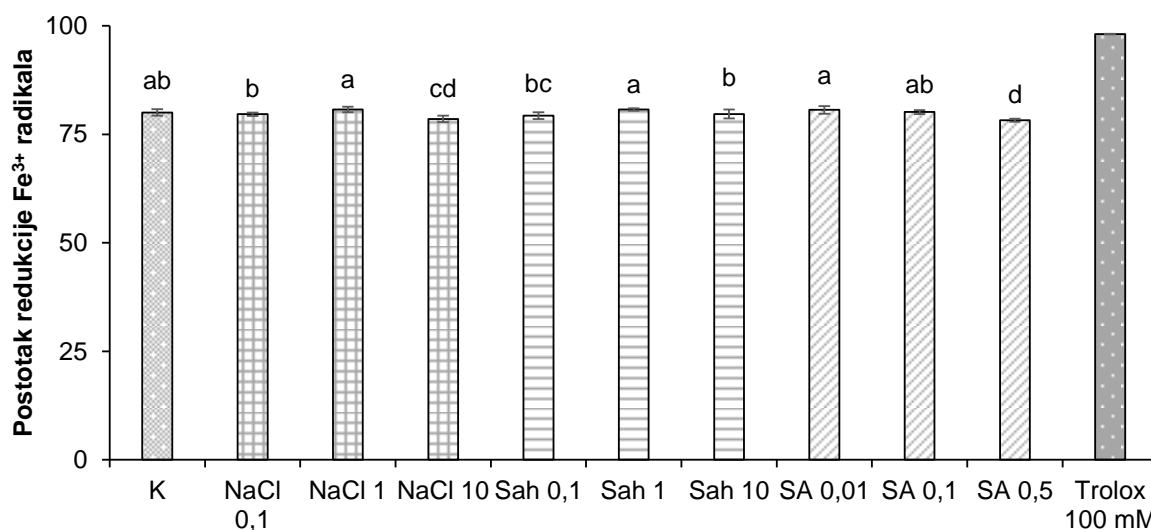
Kontrolna grupa klica pokazala je sposobnost inhibicije  $ABTS^{•+}$  radikala u iznosu od 42,81% (Slika 27). Tretmani natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL i saharozom iste koncentracije značajno su povećali antioksidacijski kapacitet klica, iznosio je redom 54,68% i 52,05%. Ova dva tretmana ujedno su jedini statistički značajno promijenili antioksidacijski kapacitet klica rotkvice. U odnosu na Trolox koncentracije 100 mM, svi tretmani pokazuju niže vrijednosti antioksidacijskog potencijala. Najniža vrijednost, ujedno i jedina statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu, zabilježena je nakon tretmana najvećom koncentracijom salicilne kiseline (0,5 mg/mL) i iznosila je 37,16%.



**Slika 27.** Antioksidacijski kapacitet klica rotkvice izmjeren metodom ABTS i izražen kao postotak inhibicije  $ABTS^{•+}$  radikala. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.4.2. Utjecaj elicitora na antioksidacijski kapacitet klica rotkvice određen metodom FRAP

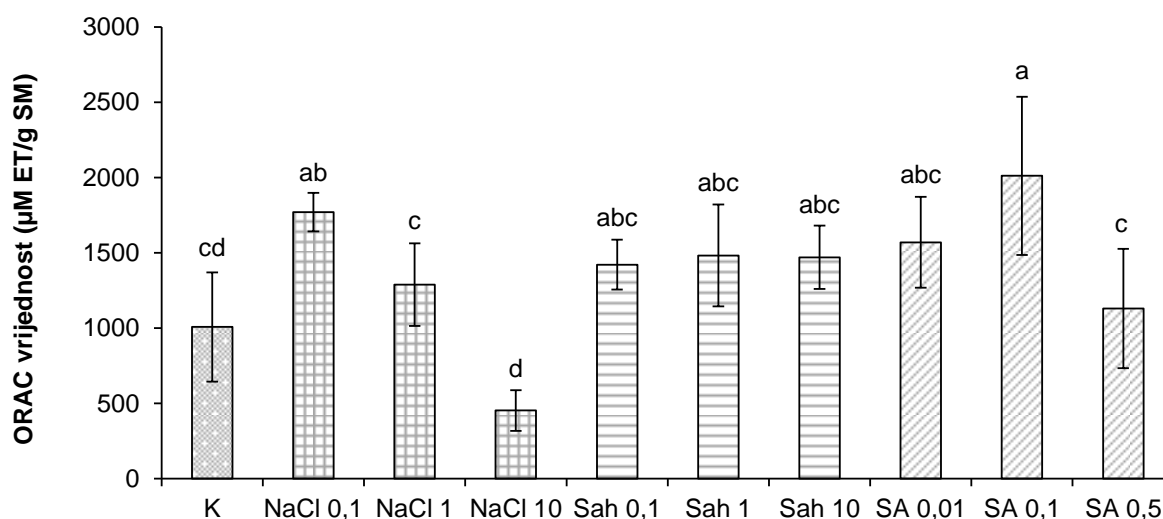
Najveći antioksidacijski potencijal klica zabilježili smo s iznosom od 80,70% redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  nakon tretmana srednjom koncentracijom saharoze, 1 mg/mL (Slika 28), međutim to nije značajna promjena u odnosu na antioksidacijski potencijal kontrolne skupine koji je iznosio 80,04% redukcije  $\text{Fe}^{3+}$ . Sličan učinak zabilježili i smo nakon tretmana natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL, te salicilnom kiselinom koncentracije 0,01 mg/mL. Najveće koncentracije natrijeva klorida (10 mg/mL) i salicilne kiseline (0,5 mg/mL) statistički su značajno smanjile postotak redukcije  $\text{Fe}^{3+}$ . U odnosu na Trolox koncentracije 100 mM, svi tretmani pokazali su niže vrijednosti postotka redukcije  $\text{Fe}^{3+}$ .



**Slika 28.** Antioksidacijski kapacitet klica rotkvice izmjeren metodom FRAP i prikazan kao postotak redukcije  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ u  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ kompleks. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.4.3. Utjecaj elicitora na antioksidacijski kapacitet klica rotkvice određen metodom ORAC

ORAC vrijednost kontrolne skupine iznosila je 1007,33  $\mu\text{M}$  ekvivalenta Troloxa po gramu suhe mase (Slika 29). Tretmani salicilnom kiselinom koncentracije 0,1 mg/mL te natrijevim kloridom koncentracije 0,1 mg/mL značajno su povećali ORAC vrijednost klica, redom 2,00 i 1,76 puta. Kod tretmana natrijevim kloridom uočili smo obrnuto proporcionalan odnos koncentracije otopine natrijeva klorida i ORAC vrijednosti uzorka. Sve tri koncentracije otopine saharoze pokazale su sličan učinak na ORAC vrijednost uzorka (tendencija rasta, ali bez statistički značajne promjene u odnosu na kontrolu).

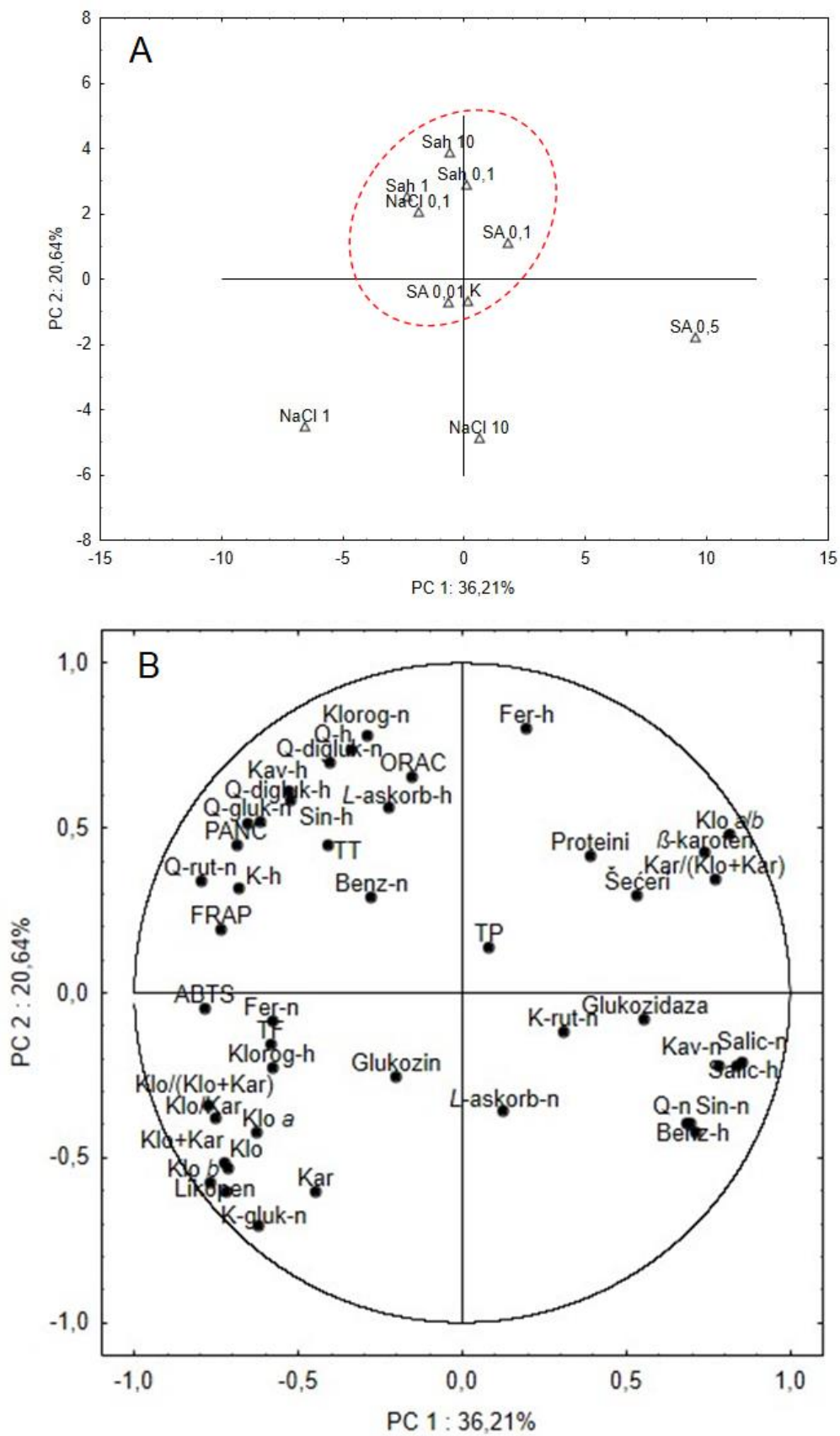


**Slika 29.** Antioksidacijski kapacitet klica rotkvice izmjeren metodom ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) i izražen u  $\mu\text{M}$  ekvivalenta Troloxa po gramu suhe mase ( $\mu\text{M ET/g SM}$ ). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike  $\pm$  standardna greška. Statistički značajno različite srednje vrijednosti označene su različitim slovom (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina. 0,01 - 10 = koncentracije vodenih otopina elicitora izražene u mg/mL.

### 3.5. Kemometrijske analize

#### 3.5.1. Analiza glavnih komponenata

Prve dvije glavne komponente (PC 1 i PC 2) objasnile su ukupno 56,85% ukupne varijabilnosti. PCA je jasno razdvojila klice tretirane salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL, natrijevim kloridom 1 mg/mL i 10 mg/mL od kontrolne i ostalih tretiranih skupina koje su se grupirale zajedno (Slika 30 A). Klice tretirane salicilnom kiselinom 0,5 mg/mL i natrijevim kloridom 1 mg/mL razdvojile su se od kontrolne skupine na osnovi PC 1, dok su se klice tretirane natrijevim kloridom 0,1 mg/mL razdvojile na temelju PC 2. Tretman koji je najmanje promijenio sastav klica bio je onaj salicilnom kiselinom 0,01 mg/mL i ta se skupina smjestila najbliže kontrolnoj. Na slici 30 B vidljivo je da su fotosintetski pigmenti smješteni uz klice tretirane natrijevim kloridom 1 mg/mL, dok su odvajanju skupine tretirane salicilnom kiselinom 0,5 mg/mL dominantno doprinijeli kvercetin, sinapinska, salicilna i kavena kiselina nehidroliziranim u uzorcima, te benzojeva i salicilna kiselina hidroliziranih uzoraka.



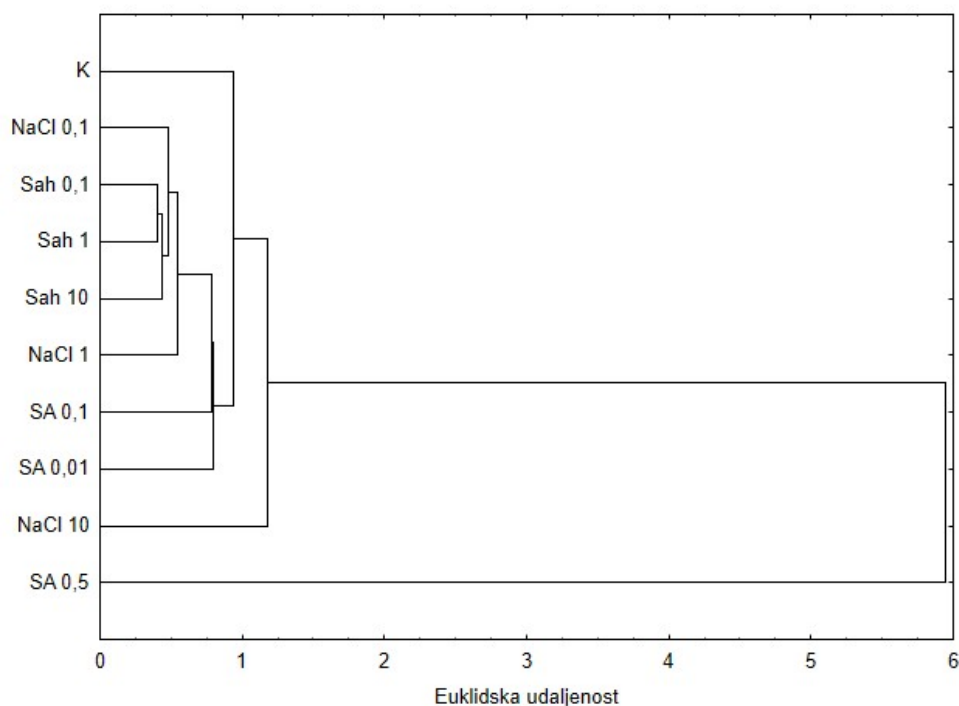
(Opis slike na sljedećoj stranici)



**Slika 30.** Dijagram (*biplot*) analize glavnih komponenata (*Principal Component Analysis*, PCA) između izmjerenih ukupnih i pojedinačnih bioaktivnih spojeva kontrolne i tretiranih skupina klica rotkvice, antioksidacijskog kapaciteta i aktivnosti spram enzima  $\alpha$ -glukozidaze. A) Grupiranje uzoraka, B) grupiranje parametara koje smo analizirali u uzorcima. K = kontrola, NaCl = natrijev klorid, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina, 0,1-10 = koncentracije u mg/mL. n = nehidrolizirani uzorci, h = hidrolizirani uzorci, ABTS, FRAP i ORAC = metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta, Benz = benzojeva kiselina, Fer = ferulična kiselina, Glukozidaza =  $\alpha$ -glukozidaza, Glukozin = ukupni intaktni glukozinolati, K = kempferol, K-gluk = kempferol-glukozid, K-rut = kempferol-rutinozid, Kar = ukupni karotenoidi, Kav = kavena kiselina, Klo = ukupni klorofili, Klo a = klorofil a, Klo b = klorofil b, Klorog = klorogenska kiselina, L-askorb = L-askorbinska kiselina, PANC = ukupni proantocijanidini, Proteini = ukupni proteini, Q = kvercetin, Q-digluk = kvercetin-3,4-diglukozid, Q-gluk = kvercetin-glukozid, Q-rut = kvercetin-rutinozid, Salic = salicilna kiselina, Sin = sinapinska kiselina, Šećeri = ukupni topivi šećeri, TF = eng. *total flavonoids*, ukupni flavonoidi, TP = eng. *total phenolics*, ukupni fenoli, TT = eng. *total tannins*, ukupni tanini.

### 3.5.2. Hijerarhijsko klasteriranje

Hijerarhijskim grupiranjem skupina dobili smo informaciju o bliskosti/različitosti pojedinih skupina na temelju svih izmjerenih parametara. Kao što je vidljivo na slici 31, najudaljenija skupina klica i u odnosu na kontrolnu skupinu i u odnosu na ostale tretirane bila je skupina inkubirana u salicilnoj kiselini koncentracije 0,5 mg/mL. Taj tretman uzrokovao je najintenzivniju promjenu klica. Skupine najbliže kontrolnoj, ujedno i najmanje promijenjene s obzirom na sve izmjerene parametre, bile su one salicilnom kiselinom koncentracija 0,01 mg/mL i 0,1 mg/mL. S obzirom na primijenjenu koncentraciju, međusobno najbliži tretmani bili su oni saharozom.



**Slika 31.** Hijerarhijsko klasteriranje, izraženo kao Euklidska udaljenost, kontrolne i tretiranih skupina klica rotkvice na temelju ukupnih i pojedinačnih bioaktivnih spojeva, njihovih fotosintetskih pigmenata, antioksidacijskog kapaciteta i aktivnosti spram enzima  $\alpha$ -glukozidaze. K = kontrola, Sah = saharoza, SA = salicilna kiselina, brojevi 0,1-10 uz oznake elicitora na y-osi = koncentracije u mg/mL.

### 3.5.3. Analiza Pearsonovih koeficijenata korelacije

Pearsonovi koeficijenti linearne korelacije između fitokemijskog sastava i antioksidacijskog kapaciteta klica rotkvice te stupnja njihove inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze prikazani su u Tablici 6. Antioksidacijska metoda ABTS pokazala je značajnu pozitivnu korelaciju s ukupnim klorofilima i klorofilom *a*, zbrojem i omjerom ukupnih klorofila i karotenoida, te udjelom klorofila u fotosintetskim pigmentima. Metoda FRAP je, s druge strane, pozitivno korelirala s ukupnim taninima, kvercetin-diglukozidom i klorogenskom kiselinom u nehidroliziranim uzorcima, te kvercetinom u hidroliziranim uzorcima. Vrijednosti metode ORAC značajno su pozitivno korelirale s ukupnim proteinima i šećerima, klorogenskom kiselinom u nehidroliziranim uzorcima, feruličnom kiselinom u hidroliziranim uzorcima, te

omjerom klorofila *a* i *b*. Najviše pozitivnih korelacija zabilježili smo za klorofil *a*, naime on korelira s klorofilom *b*, ukupnim klorofilima, likopenom, ukupnim fotosintetskim pigmentima, omjerom ukupnih klorofila i karotenoida, udjelom klorofila u fotosintetskim pigmentima, te vrijednostima antioksidacijske metode ABTS.

Stupanj inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze pozitivno je korelirao s kavenom i salicilnom kiselinom u nehidroliziranim uzorcima, te benzojevom, salicilnom i sinapinskom kiselinom u hidroliziranim uzorcima. Ukupni proteini i šećeri također su snažno pozitivno korelirali.

**Tablica 6.** Pearsonovi koeficijenti korelacije između fitokemijskog sastava, antioksidacijskog kapaciteta i stupnja inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Tamno otisnute vrijednosti značajne su na razini  $p \leq 0,05$ . n = nehidrolizirani uzorci, h = hidrolizirani uzorci, ABTS, FRAP i ORAC = metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta, Benz = benzojeva kiselina, Fer = ferulična kiselina, Glukozidaza =  $\alpha$ -glukozidaza, Glukozin = ukupni intaktni glukozinolati, K = kempferol, K-gluk = kempferol-glukozid, K-rut = kempferol-rutinozid, Kar = ukupni karotenoidi, Kav = kavena kiselina, Klo = ukupni klorofili, Klo *a* = klorofil *a*, Klo *b* = klorofil *b*, Klorog = klorogenska kiselina, L-askorb = L-askorbinska kiselina, PANC = ukupni proantocijanidini, Proteini = ukupni proteini, Q = kvercetin, Q-digluk = kvercetin-3,4-diglukozid, Q-gluk = kvercetin-glukozid, Q-rut = kvercetin-rutinozid, Salic = salicilna kiselina, Sin = sinapinska kiselina, Šećeri = ukupni topivi šećeri, TF = eng. *total flavonoids*, ukupni flavonoidi, TP = eng. *total phenolics*, ukupni fenoli, TT = eng. *total tannins*, ukupni tanini.

**TABLICA 6. NALAZI SE U PRILOGU NA KRAJU OVOG RADA JER ZBOG VELIČINE NIJE MOGLA BITI PRINTANA U A4 FORMATU.**

## 4. RASPRAVA

Poboljšanje prehrambene i zdravstvene vrijednosti biljaka nastoji se postići različitim tehnikama i metodama. Mogućnosti je nekoliko: genetičko inženjerstvo (Bailey-Serres, 2019), upotreba fertilizatora (Malik i sur., 2006), korištenje hibrida (Tokatlidis i Koutroubas, 2004) i optimizacija uzgoja (Mathan i sur., 2016). Bolje razumijevanje mogućnosti povećanja koncentracije željenih bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog potencijala biljaka, kao i poboljšanja njihova inhibitorna učinka naspram enzima ključnih za pojavu nekih bolesti u čovjeka, važno je i sa znanstvenog i s ekonomskog stajališta. Primjena egzogenih stimulansa za poticanje proizvodnje željenih specijaliziranih metabolita u biljkama sve je zastupljeniji pristup iz nekoliko razloga: ne uključuje genetičku modifikaciju biljaka koja je znatno zahtjevnija i skuplja metoda, ne iziskuje upotrebu umjetnih gnojiva, te je lako primjenjiva u svakodnevnom životu. Primjeri upotrebe elicitora za povišenje koncentracije željenih bioaktivnih spojeva do sada su zabilježeni na različitim biljnim vrstama i njihovim razvojnim stadijima. Primjerice, tretiranje sorbitolom povećalo je koncentraciju tašinsona u korijenu crvene kadulje (*Salvia miltiorrhiza*) (Shi i sur., 2007), korištenje hitozana i metil-jasmonata povećalo je koncentraciju plumbagina u kulturi korijena istoimene biljke (*Plumbago indica*) (Gangopadhyay i sur., 2011), te poticanje sinteze paklitaksela korištenjem apscizinske kiseline u staničnoj kulturi kineske tise (*Taxus chinensis*) (Luo i sur., 2001). Jasmonska kiselina korištena je kao elicitor za povećanu proizvodnju insekticida azadirachtina u kulturi korijena nima (*Azadirachta indica*) (Satdive i sur., 2007), kao i za povećanje koncentracije hipericina u gospinoj travi (*Hypericum perforatum*) koji se, osim kao insekticid, koristi i kao antidepresiv (Walker i sur., 2002). Također, povećanje koncentracije fenolnih spojeva biljaka te njihovih antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava zabilježeno je nakon primjene laktoferina na klicama zlatnog graha (*Vigna radiate*) (Randhir i sur., 2004) te klicama piskavice (*Trigonella foenum-graecum*) (Randhir i sur., 2004).

U sklopu ovog rada istražili smo mogućnost primjene tri različita tipa elicitora, natrijeva klorida, saharoze i salicilne kiseline, za poboljšanje biopotencijala klica rotkvice. Klice smo odabrali zato što su sve zastupljeniji razvojni stadij biljaka u ljudskoj prehrani zahvaljujući velikoj koncentraciji specijaliziranih metabolita koji pokazuju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje (Cevallos-Casals i Cisneros-Zevallos, 2010). Uz to, dokazano je da su klice nekih biljnih vrsta bolji izvor bioaktivnih spojeva i posjeduju jači antioksidacijski potencijal od kasnijih razvojnih stadija (Kondo i sur., 2002; Olsson i sur., 2004; Castrejón i sur., 2008; Cevallos-Casals i Cisneros-Zevallos, 2010; Šamec i sur., 2011; Cheplick i sur., 2015; Wu i sur., 2018; Chang i sur., 2018; Šola i sur., 2020). Rotkvicu smo odabrali zato što su njeni listovi i gomolj, inače do sada dominantno korišteni dijelovi ove vrste u ljudskoj prehrani, bogati bioaktivnim tvarima koje pozitivno utječu na ljudsko zdravlje (Lugast i Hóvári, 2000; Gutiérrez i Perez, 2004; Taniguchi i sur., 2007; Hara i sur., 2009; Singh i Singh, 2013; Kim i sur., 2016), dok o biopotencijalu njenih klica ima manje dostupnih podataka (Hanlon i Barnes, 2011; Baenas i sur., 2012, 2014, 2016, 2017; Li i Zhu, 2018). Natrijev klorid kao tip elicitora odabrali smo zato što je induktor solnog stresa, saharozu zato što je izvor ugljika, induktor osmotskog stresa i modulator razvojnih i metaboličkih procesa (Baenas i sur., 2014), a salicilnu kiselinu zato što je biljni hormon koji regulira otpornost spram različitih patogena (Lovelock i sur., 2016), te smo tako u mogućnosti usporediti tri potpuno različita tipa elicitora na primjeru jedne biljne vrste.

#### **4.1. Utjecaj elicitora na fenotip klica rotkvice**

Na samom početku rada, pregledom literature, definirali smo intervale koncentracija odabranih elicitora koje ćemo koristiti. Vodene otopine natrijeva klorida i saharoze u intervalu od 0,1 mg/mL do 10 mg/mL nisu inhibirale rast klica, dapače, natrijev klorid koncentracije 1 mg/mL potaknuo je rast i razvoj klica, bile su veće od kontrolne skupine koja je tretirana samo

vodom (Slika 4). Ovaj rezultat upućuje na zaključak da su klice rotkvice tolerantne spram povišenog saliniteta u okolišu, štoviše, natrijev klorid u rasponu koncentracija 0,1 mg/mL do 10 mg/mL poželjan je ukoliko se želi postići veću biomasu. Vrlo sličan rezultat zabilježili su i Yuan i sur. (2010) koji su klice rotkvice uzgajali na agaroznom mediju s natrijevim kloridom, za razliku od klica brokule kod kojih je primijećen lošiji fenotip primjenom većih koncentracija natrijeva klorida (Guo i sur., 2014). Baenas i sur. (2014) primijetili su kako saharoza pozitivno djeluje na biomasu klica porodice Brassicaceae, međutim oni su koristili veće koncentracije elicitora od nas u sklopu ovog rada. Pretpostavljamo kako je naša najviša koncentracija od 10 mg/mL bila nedovoljna za postizanje vidljivih fenotipskih promjena. S druge strane, otopine salicilne kiseline u intervalu koncentracija 0,1-10 mg/mL negativno su utjecale na rast i razvoj klica rotkvice, bile su znatno manje, kržljave i smeđe pa smo odabrali interval nižih koncentracija, 0,01 - 0,5 mg/mL, unutar kojeg rast i razvoj nisu bili inhibirani. S obzirom da je salicilna kiselina, kao kiselina, značajno snizila pH vrijednost otopine (0,01 mg/mL SA - pH 4.53, 0,1 mg/mL SA - pH 3,38, 0,5 mg/mL SA - pH 2,90), pretpostavljamo da je to jedan od glavnih razloga inhibicije rasta i razvoja klica višim koncentracijama ovog elicitora (Kang i sur, 2011; Zhao i sur., 2013). Baenas i sur. (2014) objavili su da salicilna kiselina koncentracije 100  $\mu$ M iznimno negativno djeluje na rast klica brokule, repe i kineske rotkvice, što je rezultiralo za oko 60% manjom biomasom u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom na navedeno, zaključujemo da su klice rotkvice značajno osjetljivije na salicilnu kiselinu nego na natrijev klorid i saharozu u intervalu koncentracija 0,1 mg/mL do 10 mg/mL.

## **4.2. Utjecaj elicitora na fitokemijski sastav klica rotkvice**

### **4.2.1. Utjecaj elicitora na udio ukupnih fenola u klicama rotkvice**

Udio ukupnih fenolnih spojeva u klicama rotkvice iznosio je 26,01 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase (Slika 5). Iako nismo zabilježili statistički značajan porast udjela

ove skupine spojeva nakon niti jednog od primijenjenih elicitora, na razini  $p \leq 0,05$ , uočili smo da je najintenzivnija tendencija povećanja postignuta tretmanom najnižom koncentracijom salicilne kiseline, 0,01 mg/mL i to za 7,23%. Povišenjem koncentracije salicilne kiseline, udio ukupnih fenola u klicama pokazivao je trend smanjivanja, tako da smo upotrebom najviše koncentracije, 0,5 mg/mL, zabilježili čak nešto niži udio nego u kontrolnih biljaka, međutim, kao što smo napomenuli, to nije bila statistički značajna promjena. Ovakav rezultat u skladu je s rezultatima Pérez-Balibrea i sur. (2011) koji su uočili kako niže koncentracije salicilne kiseline imaju bolji učinak na udio ukupnih fenolnih spojeva u klicama rotkvice i brokule.

S druge strane, Natella i sur. (2016) testirali su utjecaj dviju koncentracija salicilne kiseline (bliskih našoj koncentraciji od 0,1 mg/mL) na ukupne fenole u klicama brokule i zabilježili porast ove skupine spojeva nakon tretmana višom koncentracijom. Također, odnos koncentracije egzogeno dodane salicilne kiseline putem listova (folijarno, sprejanjem listova) i udjela ukupnih fenola u biljci objavljen je nedavno na primjeru ploda šipka "Mollar de Elche" (García-Pastor i sur., 2020). Naime, koncentracije 1, 5 i 10 mM salicilne kiseline (koje su najbliže našoj najvećoj koncentraciji od 0,5 mg/mL) značajno su povećale udio ukupnih fenola u odnosu na kontrolnu skupinu i to proporcionalno primijenjenoj koncentraciji. Ovakav rezultat sugerira da utjecaj egzogeno primijenjene salicilne kiseline na ukupne fenolne spojeve u biljci nije univerzalan, već specifičan i očito ovisi i o biljnoj vrsti i o primijenjenoj koncentraciji.

Što se tiče tretmana natrijevim kloridom, zabilježili smo statistički značajan pad udjela ukupnih fenola u odnosu na kontrolnu grupu nakon tretmana svim trima koncentracijama, s tim da je najveća koncentracija natrijeva klorida uzrokovala značajniji pad u odnosu na srednju i najnižu koncentraciju. Osjetljivost fenolnog sustava biljke na različite koncentracije natrijeva klorida primijetili su već i Kim i sur., (2008) te Petridis i sur., (2012). Yuan i sur. (2010) primijetili su isti učinak kod klica rotkvice uzgajanih na agaroznom mediju, međutim



iako je u njihovom eksperimentu najviša koncentracija natrijeva klorida (koja je bila slična našoj koncentraciji od 10 mg/mL) smanjila udio ukupnih fenola u odnosu na kontrolnu skupinu, to nije bilo statistički značajno na razini  $p \leq 0,05$ . Natella i sur. (2016) pratili su utjecaj natrijeva klorida na udio fenolnih spojeva u klicama brokule i uočili da se pri nižim koncentracijama ne mijenja udio, a pri višoj (100 mM), koja je između naših koncentracija od 1 i 10 mg/mL, čak povećava udio fenolnih spojeva. Guo i sur. (2013) zabilježili su porast udjela fenola u uzorcima klica brokule tek upotrebom otopine natrijeva klorida koncentracije 160 mM (što je koncentracija slična našoj od 10 mg/mL), a niže koncentracije navedenog elicitora smanjile su udio fenolnih spojeva u odnosu na kontrolu skupinu.

Tretmani najvišom i najnižom koncentracijom saharoze značajno su smanjili udio fenolnih spojeva u klicama rotkvice, dok srednja koncentracija (1 mg/mL) nije utjecala na količinu ovih spojeva. Natella i sur. (2016) zabilježili su značajno povećanje udjela ukupnih fenola u klicama brokule izloženih saharozi, međutim oni su koristili znatno više koncentracije ovog elicitora od nas u sklopu provedenog eksperimenta te ne možemo precizno usporediti rezultate.

#### **4.2.2. Utjecaj elicitora na udio ukupnih flavonoida u klicama rotkvice**

Udio ukupnih flavonoida u klicama rotkvice iznosio je 11,37 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase (Slika 6). Statistički značajan porast ove grupe spojeva u klicama uočili smo nakon tretmana najvišom koncentracijom, 10 mg/mL, natrijeva klorida i saharoze. Pretpostavljamo da su ovi elicitori povećali ekspresiju gena za halkon-sintazu, ključni enzim u biosintetskom putu flavonoida. Štoviše, Guo i suradnici (2011b) pokazali su kako je saharoza u klicama brokule povećala ekspresiju gena za halkon-sintazu, halkon-izomerazu, flavanon-3-hidroksilazu i flavonoid-3'-hidroksilazu, što su sve enzimi ključni u biosintetskom putu flavonoida. Sličan rezultat zabilježen je nakon tretmana klica leće i graha

natrijevim kloridom (Świeca, 2015; Taïbi i sur., 2016). Oba su ova elicitora s povećanjem koncentracije pokazala tendenciju povišenja udjela flavonoida, što je zabilježeno i kod klica leće tretiranih različitim koncentracijama natrijeva klorida (Świeca, 2015). Za usporedbu, kod klica brokule natrijev klorid nije utjecao na količinu ukupnih flavonoida, a saharoza je, baš kao i u našem eksperimentu, značajno povisila udio ove skupine spojeva (Natella i sur., 2016). Tretmani salicilnom kiselinom djelovali su upravo obrnuto, najmanju vrijednost (10,31 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase) zabilježili smo nakon tretmana najnižom koncentracijom salicilne kiseline, međutim te promjene nisu bile statistički značajne. Suprotno našem rezultatu, kod klica brokule zabilježen je značajan porast udjela ukupnih flavonoida nakon tretmana salicilnom kiselinom (Natella i sur., 2016), što govori o specifičnosti odgovora različitih vrsta na ovaj elicitora.

#### 4.2.3. Utjecaj elicitora na udio ukupnih tanina u klicama rotkvice

Udio ukupnih tanina u klicama rotkvice iznosio je 14,59 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase (Slika 7). Niti jednim od tretmana nije došlo do značajnog povećanja udjela tanina, dok su tretmani natrijevim kloridom koncentracija 0,1 mg/mL i 10 mg/mL, saharozom koncentracije 0,1 mg/mL, te salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL značajno smanjili količinu ukupnih tanina u klicama. S obzirom da tanini, zbog svog precipitirajućeg djelovanja na proteine (umrežuju ih), nisu poželjni spojevi u biljkama koje čovjek konzumira (Furlan i sur., 2011), tretmani koji smanjuju njihov udio u biljci mogli bi biti jedan od primjera kako na jednostavan i ekološki prihvatljiv način biljke oporog (stežućeg) okusa učiniti ugodnijima za konzumaciju.

Kao očit primjer takvih biljaka izdvojit ćemo izuzetno zdrav plod aronije (rod *Aronia*) koji, zbog stežućeg efekta u ustima, ljudi izbjegavaju konzumirati u svježem obliku. Egzogen primjena prirodnih spojeva koji bi mogli smanjiti količinu tanina u ovoj vrsti, bez

negativnog učinka na udjele ostalih bioaktivnih spojeva, potencijalno bi mogla doprinijeti učestalijoj konzumaciji ovih plodova, a posredno i boljem zdravlju čovjekova organizma. Kang i sur. (2018) pokazali su kako inokulacija kombinacijom različitih bakterijskih kultura (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* i *Saccharomyces cerevisiae*) dovodi do povećanog udjela acetaldehida u koncentratima aronije. Reakcijom acetaldehida s kondenziranim taninima nastaju modificirani tanini, što rezultira nižim stupnjem agregacije tanina s proteinima u komplekse. Mjerenjem udjela tanina te organoleptičkim analizama nakon inokulacije, potvrdili su kako je ovim tretmanom dobivena aronija manje oporog okusa.

#### **4.2.4. Utjecaj elicitora na udio ukupnih proantocijanidina u klicama rotkvice**

Udio ukupnih proantocijanidina (kondenziranih tanina) u klicama rotkvice bio je 17,42 mg ekvivalenata sinigrina po gramu suhe mase (Slika 8). Niti jednim od tretmana nismo uspješno povećali udio ovih spojeva u klicama, no najniža koncentracija natrijeva klorida, 0,1 mg/mL, pokazala je tendenciju rasta koncentracije proantocijanidina. Pretpostavljamo da bi još niža koncentracija možda dovela do značajnog porasta udjela ovih spojeva, pa je to ujedno i prijedlog za smjer daljnjeg istraživanja ove teme. Statistički značajna promjena koju smo primijetili u svom istraživanju jest smanjen udio proantocijanidina nakon tretmana najvećom koncentracijom salicilne kiseline, 0,5 mg/mL, i pretpostavljamo da je razlog tome nizak pH (2,90) koji je vjerojatno uzrokovao depolimerizaciju ovih oligomera i polimera.

Nedavno su Wang i sur. (2019) utvrdili kako korištenje saharoze može povećati udio proantocijanidina. Kultivirali su grančice vrste *Camellia sinensis* u otopinama saharoze koncentracije 90 mM (što je tri puta veća koncentracija od maksimalne korištene u našem istraživanju) te utvrdili kako je takav tretman već nakon devet sati doveo do povećane

ekspresije transkripcijskih faktora uključenih u regulaciju biosinteze proantocijanidina, antocijana i flavonola. U narednim bi se istraživanjima mogle koristiti veće koncentracije saharoze i utvrditi jesu li u rotkvicama procesi biosinteze proantocijanidina regulirani istim transkripcijskim faktorima. Pretpostavljamo da bi u našem istraživanju na rotkvici korištenjem većih koncentracija saharoze možda značajnije povećali udio proantocijanidina.

#### 4.2.5. Utjecaj elicitora na udio ukupnih topivih šećera u klicama rotkvice

Udio ukupnih topivih šećera koji smo zabilježili u klicama rotkvice bio je 5,86 mg ekvivalenta saharoze po gramu suhe mase (Slika 9). Glavni su topivi šećeri u vrsta roda *Brassica* fruktoza, glukoza i saharoza (King i Morris, 1994) pa pretpostavljamo da isti dominiraju i u klicama rotkvice. Šećeri u biljkama služe kao čistači slobodnih kisikovih spojeva (ROS), te stabilizatori membrana i proteina u stanicama izloženih različitim stresnim stimulansima (Pommerrenig i sur., 2018). Npr. u slučajevima kada se temperatura okoliša snizi na 0 °C ili ispod te vrijednosti, šećeri induciraju proces vitifikacije na plazmatskoj i unutarstaničnim membranama, tj. ograničenu dostupnost molekula vode nadomještaju svojim hidroksilnim skupinama koje održavaju integritet membrana (Pommerrenig i sur., 2018). Također su i supstrati u oksidativnoj fosforilaciji, biosintezi celuloze i hemiceluloze, modificiraju proteine i lipide, sudjeluju u staničnoj sintezi mnogih primarnih i specijaliziranih metabolita, te su jedini supstrati za sintezu šećernih alkohola, kao što su sorbitol i manitol, koji su izuzetni čistači ROS-ova.

Elicitori koji značajno utječu na koncentraciju topivih šećera u biljci vjerojatno utječu i na niz prethodno navedenih svojstava biljke, te bi ih se moglo koristiti za modifikaciju staničnih procesa u željenom smjeru, primjerice za proizvodnju klica otpornijih na niske temperature. Mi smo u svom radu uočili značajan porast šećera u klicama rotkvice nakon tretmana višim koncentracijama salicilne kiseline (0,1 mg/mL i 0,5 mg/mL), te pretpostavljamo da bi

primjena ovog elicitora, u zadanim koncentracijama, mogla povećati toleranciju klica rotkvice na niže temperature. Ovu ideju sugeriramo kao jedan od rezultata našeg istraživanja u sklopu ovog rada. Isto tako, tijekom analiza ukupnih šećera, uočili smo izraženija odstupanja od srednjih vrijednosti nego u ostalim analizama. To pripisujemo činjenici da unutar biljke pod stresom, kao biološke jedinice, različita tkiva mogu dati različite odgovore, a ponekad čak i suprotne, kao što su to komentirali Fraire-Velázquez i Balderas-Hernández (2013). Isto tako, Gavaghan i sur. (2011) primijetili su da su metaboličke promjene različitih tkiva u kukuruzu pod stresom različite, što također rezultira većim odstupanjima tijekom mjerenja.

Suvremenu prehranu često karakterizira pretjerani unos različitih tipova ugljikohidrata, od probavljivih polisaharida do rafiniranih šećera koji kolektivno posreduju štetnim učincima na ljudsko zdravlje, fenomen poznat pod nazivom "karbotoksičnost" (Kroemer i sur., 2018). Stoga je poželjno da biljke koje koristimo u prehrani sadrže što manje ugljikohidrata. U našem eksperimentu, jedino je tretman natrijevim kloridom (1 mg/mL) značajno snizio udio šećera u klicama rotkvice. Isti utjecaj zabilježen je i na klicama mrkve, dok je suprotan na klicama trputca (Gorham i sur., 1981). Zanimljivo je da su tretmani višim koncentracijama salicilne kiseline (0,1 mg/mL i 0,5 mg/mL) uzrokovali značajan porast koncentracije ukupnih topivih šećera u klicama rotkvice, dok tretmani saharozom nisu. Očekivali smo da će upravo tretmani saharozom značajno povisiti udio ukupnih topivih šećera u klicama, no to nije bio slučaj. Iz ovoga zaključujemo da je salicilna kiselina koncentracija 0,1 mg/mL i 0,5 mg/mL, kao signalna molekula, ili potaknula *de novo* sintezu šećera, ili oslobodila šećerne molekule iz nekih kompleksnih spojeva u klicama rotkvice.

S obzirom da je salicilna kiselina hormon stresa u biljnom organizmu, zaključujemo da je jedan od mehanizama kojim se klice rotkvice prilagođavaju abiotičkom stresu povećanje koncentracije šećera. S druge strane, pretpostavljamo da egzogeno dodane molekule

saharoze nisu rezultirale značajnim povišenjem udjela ukupnih topivih šećera u klicama rotkvice zato što se apsorbirana saharoza ne akumulira već odmah sudjeluje kao supstrat u biokemijskim reakcijama unutar klica, npr., saharoza je ključna za biosintezu *L*-askorbinske kiseline (Pérez-Balibrea i sur., 2011) pa je to jedna od mogućih daljnjih reakcija.

#### 4.2.6. Utjecaj elicitora na udio ukupnih proteina u klicama rotkvice

Udio ukupnih proteina u klicama rotkvice iznosio je 0,73 mg ekvivalenta goveđeg albumina seruma po gramu suhe mase (Slika 10). Značajan porast udjela proteina uočili smo nakon tretmana saharozom koncentracije 0,1 mg/mL, te salicilnom kiselinom koncentracija 0,1 mg/mL i 0,5 mg/mL. Štoviše, salicilna kiselina koncentracije 0,1 mg/mL povećala je udio proteina čak 4,21 put u odnosu na kontrolnu skupinu. Sličan rezultat zabilježen je i na klicama pšenice pod vodnim stresom koje su tretirane gotovo identičnom koncentracijom salicilne kiseline (Singh i Usha, 2003). Jedini tretman koji je značajno smanjio udio proteina u klicama bio je onaj najvišom koncentracijom (10 mg/mL) natrijeva klorida. Isti rezultat zabilježen je i na *in vitro* uzgojenoj paulovnji, naime, natrijev klorid (10 mg/mL) značajno je smanjio količinu proteina (Ayala-Astorga i Alcaraz-Meléndez, 2010). Pretpostavljamo da u regulaciji količine proteina nakon izlaganja klica elicitorima sudjeluju i transkripcijski i posttranskripcijski mehanizmi.

#### 4.2.7. Utjecaj elicitora na udio ukupnih intaktnih glukozinolata u klicama rotkvice

Udio ukupnih intaktnih glukozinolata u klicama rotkvice iznosio je 55,37 mg ekvivalenta sinigrina po g suhe mase (Slika 11). Značajan porast ovih spojeva zabilježili smo samo nakon tretmana salicilnom kiselinom koncentracije 0,1 mg/mL, i to za 23,26%. Viša koncentracija kiseline djelovala je negativno i značajno smanjila količinu glukozinolata. Pretpostavljamo da je mogući razlog nizak pH koji je doveo do hidrolize glukozinolatnih

molekula na njihove gradivne podjedinice. Zanimljivo je da su kod klica brokule, koje su bile stare otprilike kao i naše klice rotkvice, niže koncentracije salicilne kiseline također pozitivno djelovale na količinu glukozinolata, dok je u našem eksperimentu najniža koncentracija salicilne kiseline smanjila udio glukozinolata u klicama rotkvice (Pérez-Balibrea i sur., 2011). Iz ovoga zaključujemo da su glukozinolati u klicama rotkvice osjetljiviji na tretman salicilnom kiselinom od onih u klica brokule. Klice repe tretirane su samo jednom koncentracijom salicilne kiseline, 0,1 mg/mL, i također je došlo do povećanja količine ukupnih glukozinolata (Smetanska i sur., 2007).

Natrijev klorid koncentracije 1 mg/mL pokazao je tendenciju povećanja udjela glukozinolata, dok je ista koncentracija saharoze djelovala obrnuto i statistički značajno smanjila udio ovih spojeva u klicama rotkvice. Lopez-Berenguer i sur. (2008) primijetili su kako elicitacija otopinom natrijeva klorida koncentracije 40 mM (što je najbližije koncentraciji od 1 mg/mL korištenoj u ovom radu) ima pozitivan učinak na udio glukozinolata u listovima brokule već nakon jednog dana. Njihovi rezultati upućuju na povećanje udjela ukupnih glukozinolata i primjenom većih koncentracija natrijeva klorida, no elicitaciju je potrebno provoditi 15 dana. S obzirom da smo mi u našem eksperimentu testirali utjecaj elicitora na promjene udjela fitokemijskih spojeva nakon samo tri dana, u kasnijim bi se istraživanjima moglo ispitati kakav će učinak korišteni elicitori imati nakon duljeg tretmana.

Saharoza je generalno pri sve tri koncentracije pokazala tendenciju smanjivanja udjela glukozinolata u klicama rotkvice. Slično kao u našem eksperimentu s rotkvicom, natrijev klorid slične koncentracije negativno je djelovao i na klice tri kultivara brokule (Guo i sur., 2013), kao i na listove brokule stare 22 i 36 dana (López-Berenguer i sur., 2008). Nasuprot tome, tretman značajno višim koncentracijama saharoze (176 mM) doveo je do povećanja udjela glukozinolata u klicama brokule (Guo i sur., 2011a). Ovi podaci ukazuju na

specifičnost odgovora različitih vrsta spram istog elicitora i njegove koncentracije. U klicama brokule koje su bile tretirane saharozom koncentracije 88 mM (što je najbliže koncentraciji od 10 mg/mL upotrijebljenoj u našem eksperimentu), Guo i sur. (2011b) nisu primijetili značajnu promjenu pojedinih vrsta glukozinolata, što odgovara i našem rezultatu na klicama rotkvice gdje se udio ukupnih glukozinolata nije značajno promijenio.

#### 4.2.8. Utjecaj elicitora na udio ukupnih fotosintetskih pigmenata u klicama rotkvice

Klorofile se smatra najvažnijim organskim spojevima na Zemlji s obzirom da bez njih ne bi bilo fotosinteze (Willows, 2004). Informacije o sadržaju fotosintetskih pigmenata u biljci pružaju uvid u njeno fiziološko stanje (Sims i Gamon, 2002). Smanjivanje udjela klorofila znak je da je biljka izložena stresu (Hendry i Price, 1993) i upućuje na fotoprotektivni mehanizam redukcijom stupnja apsorpcije svjetla smanjenjem količine klorofila (Elsheery i Cao, 2008). U kontrolnoj skupini klica rotkvice zabilježili smo ukupnih klorofila u iznosu od 25,82 mg/g SM, od čega je 74% bio klorofil *a*, a 26% klorofil *b* (Tablica 3). Ovakav je odnos od otprilike 3:1 u korist klorofila *a* uobičajen (Katayama i Shida, 1970). Samo je tretman natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL doveo do značajne promjene udjela ukupnih klorofila, porastao je za 30%. Isti rezultat zabilježen je ranije i na klicama drvenaste sukulentne vrste *Zygophyllum xanthoxylum* (Ma i sur., 2011). Neka su istraživanja pokazala da natrijev klorid može stimulirati biosintezu klorofila aktivacijom ključnih enzima (Brownell i Bieligi, 1996; Subbarao i sur., 1999). Štoviše, ioni natrija imaju važnu ulogu u proliferaciji kloroplasta (Subbarao i sur., 1999). Ovi mehanizmi vjerojatno su bili aktivni i u klicama rotkvice tretiranim natrijevim kloridom u našem pokusu. Naš rezultat u sklopu ovog rada ukazuje i na važnost koncentracije primijenjenog natrijeva klorida, niža ili viša koncentracija od optimalne ne će promijeniti količinu klorofila u biljci.



Varijacije omjera klorofila *a* i *b* indikatori su senescencije, stresa ili oštećenja fotosintetskog aparata i utječu na odvijanje ostalih bioprocasa u biljci (Filimon i sur., 2015). Zabilježili smo omjere u intervalu 2,04 do 3,57, što je u rangu omjera zabilježenih i kod uročnjaka (Zhang i sur., 2008). U usporedbi s kontrolnom skupinom klica rotkvice u kojoj je omjer iznosio 2,84, vrijednost se značajno promijenila samo nakon tretmana natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL, smanjila se za 28% i iznosila je 2,04. S obzirom da su i klorofil *a* i klorofil *b* porasli nakon ovog tretmana, zaključujemo da je klorofil *b* osjetljiviji na spomenuti tretman (porastao je za čak 64%). Zanimljivo, tijekom u laboratoriju izazvane senescencije kotiledona rotkvice omjer klorofila *a* i *b* porastao je (Suzuki i Shioi, 2004), što znači da je *a* forma klorofila tijekom starenja rotkvice relevantnija od *b* forme. Ovakvi rezultati sugeriraju na različite mehanizme prilagodbe rotkvice na razini fotosintetskog aparata spram solnog stresa i senescencije.

Od oko 50 tipova karotenoida koji se nalaze u uobičajenoj ljudskoj hrani biljnog podrijetla, 20 tipova je pronađeno u krvi (plazmi ili serumu) (Khachik i sur., 1992; Khachik i sur., 1998), a neki i u eritrocitima (Nishino i sur., 2015). Među njima,  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten, likopen,  $\beta$ -kriptoksantin, lutein i zeaksantin čine 90% od ukupnih karotenoida (Khachik i sur., 1998). U sklopu našeg rada, u kontrolnim klicama rotkvice zabilježili smo karotenoida u iznosu od 5,81 mg/g SM, (Tablica 4), što je u rangu vrijednosti koje su zabilježili i Korekar i sur. (2014), de Azevedo i sur. (2005), te Khachick i sur. (1986). Na količinu ukupnih karotenoida u klicama rotkvice niti jedan od tretmana nije značajno djelovao, iako je natrijev klorid koncentracije 1 mg/mL pokazao tendenciju rasta (zabilježili smo porast od 8,43%). Drugačiji učinak zabilježen je kod listova vrste *Vetiveria zizanioides*, naime natrijev klorid koncentracija 25 mM i 50 mM povećao je udio karotenoida, dok su više koncentracije natrijeva klorida značajno smanjile udio karotenoida (Mane i sur., 2011). S obzirom da su karotenoidi jedan od neenzimatskih oblika antioksidansa, poput vitamina C i E, te, između

ostalog, štite kloroplaste od fotooksidativnih oštećenja (Mane i sur., 2011), poželjan je porast njihova udjela u biljci. Isto tako, karotenoidi imaju važnu ulogu i u životinjskom organizmu, iako ih one ne mogu sintetizirati *de novo*, nego ih uzimaju hranom biljnog podrijetla, gdje služe kao antioksidansi, zaštita od UV zraka, poboljšavaju imunitet, djeluju antikancerogeno, te doprinose reprodukciji (Maoka, 2020). Zato su tretmani koji doprinose povećanju količine karotenoida u biljci itekako poželjni, te bismo mi, u slučaju klica rotkvice, između naših tretmana odabrali natrijev klorid koncentracije 1 mg/mL.

Što se tiče pojedinačnih karotenoida, zabilježili smo 0,31 mg/kg SM  $\beta$ -karotena i 0,88 mg/kg SM likopena u klicama rotkvice, što je omjer vrlo sličan onome u različitim kultivarima rajčice (Borghesi i sur., 2011). Vrlo slična vrijednost  $\beta$ -karotena u klicama različitih kupusnjača već je zabilježena, štoviše, klice rotkvice sadržavale su najvišu koncentraciju klorofila i karotenoida (Suzuki i Shioi, 2004; Abney i Kopsell, 2009; Kundan i sur., 2014). Što se tiče likopena u klicama rotkvice koje smo mi analizirali, zabilježili smo veću koncentraciju nego li je izmjerena u crvenom kupusu ili repi (Collins i sur., 2006). Nakon inkubacije elicitorima, uočili smo da je samo tretman natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL značajno utjecao na udjele  $\beta$ -karotena i likopena, no, zanimljivo, u suprotnom smjeru. Naime, značajno je smanjio količinu  $\beta$ -karotena, ali povećao količinu likopena. S obzirom da su likopen  $\beta$ -ciklaze odgovorne za pretvorbu likopena u  $\beta$ -karoten (Zeng i sur., 2015), pretpostavljamo da je natrijev klorid pri koncentraciji od 1 mg/mL utišao ekspresiju gena za ove enzime. Ovakav inhibirajući učinak solnog stresa na ekspresiju gena za likopen  $\beta$ -ciklaze već je zabilježen u rajčici (Ann i sur., 2011). Poznato je da se likopen akumulira u prostati i smanjuje rizik od pojave raka prostate (Rock, 2009; Story i sur., 2010), stoga bi biljke povećane koncentracije ovog karotenoida mogle poslužiti kao hrana dodane vrijednosti.

Omjer ukupnih klorofila i karotenoida u klicama rotkvice iznosio je između 3,97 (tretirane najvišom koncentracijom salicilne kiseline) i 5,35 (tretirane natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL), što je nešto niži interval u odnosu na onaj zabilježen kod uročnjaka (Zhang i sur., 2008), a viši u odnosu na onaj kod listova vinove loze (Filimon i sur., 2015). Jedini tretman koji je značajno promijenio ovaj omjer bio je onaj natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL, povećao ga je u odnosu na kontrolnu skupinu klica, što sugerira da je ovaj tretman značajnije povećao udio klorofila od udjela karotenoida u klicama. To pak znači da su u klicama rotkvice ukupni klorofili osjetljiviji na solni stres od ukupnih karotenoida. Veća „osjetljivost“ klorofila u odnosu na karotenoide primijećena je prethodno i kod biljaka izloženih vodnom stresu (Lisar i sur., 2012), kao i tijekom prirodnog procesa sensencije (Biswal, 1995).

#### **4.2.9. Utjecaj elicitora na koncentraciju pojedinačnih fenolnih spojeva i L-askorbinske kiseline u klicama rotkvice**

U klicama rotkvice metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja uspjeli smo identificirati ukupno 14 spojeva: 2 flavonoida, kempferol i kvercetin, te njihove glikozide (2 glukozida, 1 diglukozid i 2 rutinozida). Od fenolnih kiselina identificirali smo njih šest, sinapinsku, feruličnu, benzojevu, klorogensku, kavenu i salicilnu, a od vitamina *L*-askorbinsku kiselinu (vitamin C).

##### **4.2.9.1. Utjecaj elicitora na koncentraciju kempferola i njegovih derivata u klicama rotkvice**

Flavonoid kempferol u klicama rotkvice bio je prisutan u glikozidnom obliku, naime tek nakon kiselinske hidrolize detektirali smo ga u slobodnom obliku i to u koncentraciji od 1,59 g/kg SM (Slika 12). Do njegova značajna porasta došlo je nakon tretmana klica natrijevim kloridom koncentracija 0,1 i 10 mg/mL, te saharozom koncentracije 10 mg/mL, redom za

57%, 52% i 57% u odnosu na kontrolnu grupu, što sugerira njegovu ulogu u obrani klica rotkvice od solnog i osmotskog stresa.

Glikozidni oblici kempferola koje smo uspjeli identificirati bili su kempferol-glukozid koncentracije 639,30 mg/kg SM (Slika 13) i kempferol-rutinozid koncentracije 7,57 mg/kg SM (Slika 14). S obzirom da smo detektirali 2,46 puta veću koncentraciju slobodnog kempferola (Slika 12) u odnosu na zbroj glukozida i rutinozida, zaključujemo da su u klicama rotkvice prisutni i drugi tipovi glikoziliranog kempferola. Jedina dva tretmana koja su pokazala trend porasta udjela kempferol-glukozida u klicama bili su oni natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL i 10 mg/mL (povećanje za 37% u odnosu na netretirane klice), no na razini  $p \leq 0,05$  to nije bilo značajno. Povećanjem koncentracije natrijeva klorida primijetili smo tendenciju porasta udjela kempferol-glukozida u klicama, a u slučaju salicilne kiseline trend je bio obrnut – povećanjem koncentracije salicilne kiseline, udio kempferola u klicama smanjivao se. Ovo je bilo i za očekivati s obzirom da se povećanjem koncentracije kiseline povećava i stupanj hidrolize glikozidnih veza.

Tretmani saharozom nisu značajno utjecali ni na udio kempferol-glukozida, ni na udio kempferol-rutinozida. Uz to, udio kempferol-rutinozida bio je dosta varijabilan među biološkim replikama pa zaključujemo da je konverzija ovog spoja u klicama rotkvice intenzivna.

#### **4.2.9.2. Utjecaj elicitora na koncentraciju kvercetina i njegovih derivata u klicama rotkvice**

Kao i u slučaju kempferola, tako je i kvercetin zabilježen u znatno većoj koncentraciji nakon hidrolize uzoraka, što upućuje na zaključak da je u klicama dominantno prisutan u derivatiziranim oblicima (Slika 15 A i B). Niti jedan od tretmana nije povećao koncentraciju kvercetina u klicama, štoviše, saharoza koncentracije 1 mg/mL čak je i smanjila njegovu

koncentraciju u nehidroliziranim uzrocima (Slika 15 A). Nakon hidrolize, primijetili smo da je natrijev klorid koncentracije 10 mg/mL značajno smanjio koncentraciju kvercetina (Slika 15 B). S obzirom da je ovaj tretman značajno povećao koncentraciju kempferola, a i pokazao tendenciju porasta koncentracije glikozida kempferola, pretpostavljamo da je natrijev klorid koncentracije 10 mg/mL usmjerio flavonoidni biosintetski put ka sintezi kempferola, na račun kvercetina. Očito je kempferol, kao dominantan flavonol u rotkvici, jedan od glavnih spojeva u obrani rotkvice od solnog stresa. S obzirom da je enzim flavonoid 3`-hidroksilaza ključan za prevođenje kempferola u kvercetin (Saito i sur., 2013), pretpostavljamo da je natrijev klorid koncentracije 10 mg/mL inhibirao njegovu aktivnost. Za usporedbu, u listovima krumpira uzgojenog pri solnom stresu oba flavonola, kempferol i kvercetin, bili su smanjene koncentracije u odnosu na kontrolu, ali su se zato akumulirale hidroksicimne kiseline (Martinez i sur., 2016)

Među derivatima kvercetina identificirali smo kvercetin-3,4-diglukozid, kvercetin-glukozid i kvercetin-rutinozid (Slika 16, 17, i 18). Nakon hidrolize prisutan je bio još samo kvercetin-3,4-diglukozid, vjerojatno zato što taj flavonoid sadrži dvije molekule glukoze za čije su otcjepljenje potrebni duže vrijeme i/ili jača kiselina tijekom procesa hidrolize. Značajno povećanje koncentracije kvercetin-glukozida uzrokovali su tretmani natrijevim kloridom koncentracije 0,1 mg/mL te saharozom koncentracije 10 mg/mL (Slika 17). Zanimljivo je da su koncentraciju kvercetin-rutinozida značajno povećali svi tretmani natrijevim kloridom i saharozom, što znači da je ovaj spoj izuzetno osjetljiv spram ova dva elicitora i vjerojatno sudjeluje u prilagodbi rotkvice na solni, odnosno osmotski stres. Isti rezultat zabilježen je i na primjeru krumpira uzgojenog pri uvjetima solnog stresa, koncentracija kvercetin-rutinozida je porasla (Martinez i sur., 2016). Tretman salicilnom kiselinom najviše koncentracije (0.5 mg/mL) značajno je smanjio koncentraciju kvercetin-rutinozida, pretpostavljamo da je došlo do hidrolize glikozidne veze i oslobađanja

aglikonskog oblika, kvercetina. I ovaj slučaj ukazuje na osjetljivost kvercetin-rutinozida spram elicitora, te sugerira ulogu ovog spoja u obrambenom odgovoru klica rotkvice na abiotički stres.

#### **4.2.10. Utjecaj elicitora na koncentraciju pojedinačnih fenolnih kiselina u klicama rotkvice**

Fenolne kiseline karboksilne su kiseline izvedene iz skeleta benzojeve ili cimetine kiseline. Ubrajamo ih među najrasprostranjenije biljne neflavonoidne fenolne spojeve koji mogu biti u slobodnom, konjugiranom topivom ili netopivom (za staničnu stijenkku vezanom) obliku. Posjeduju značajna antioksidativna svojstva i sudjeluju u staničnim signalnim putevima (Chandrasekara, 2018) i kao takve sudjeluju u obrani biljke od okolišnog stresa. U sklopu ovog rada identificirali smo sinapinsku, feruličnu, benzojevu, klorogensku, kavenu i salicilnu kiselinu u klicama rotkvice.

##### **4.2.10.1. Utjecaj elicitora na udio benzojeve kiseline u klicama rotkvice**

Benzojeve kiseline bilo je nešto više u hidroliziranim uzorcima (Slika 19 A i B), što nam govori da je ova kiselina u klicama rotkvice prisutna i u slobodnom i u derivatiziranom obliku. Na koncentraciju slobodne benzojeve kiseline u klicama nije utjecao niti jedan od elicitora, no nakon hidrolize uočili smo značajno povećanje koncentracije tretmanom salicilnom kiselinom najveće koncentracije (0.5 mg/mL), što znači da je ovaj tretman potaknuo nastanak derivatiziranog/ih oblika benzojeve kiseline. Ovakav smo rezultat očekivali, naime, salicilna je kiselina 2-hidroksibenzojeva kiselina i ovdje je vjerojatno, nakon apsorpcije u klice, došlo do odcjepljenja hidroksilne skupine i derivatizacije novonastale benzojeve kiseline. S obzirom da je salicilna kiselina hormon stresa i sudjeluje u mnogim signalnim putevima, njena prevelika koncentracija u klicama značila bi

narušavanje fiziološke homeostaze. Zato je biljka „kemijski obradi“ kako bi ublažila akumuliranje prevelike koncentracije ovog signala stresa. *In vivo* kemijska derivatizacija salicilne kiseline u svrhu obrane biljke već je zabilježena i tijekom napada patogena (Lovelock i sur., 2016; Ludwig-Müller i sur., 2015). O ulozi benzojeve kiseline u obrambenom odgovoru biljaka spram stresa pronašli smo daleko manje informacija nego o ulozi salicilne kiseline, poznatog hormona stresa kod biljaka. Dokazano je, primjerice, da benzojeva kiselina inducira otpornost vrste *Banksia attenuata* prema *Phytophthora cinnamomi* (Williams i sur., 2003).

#### 4.2.10.2. Utjecaj elicitora na udio ferulične kiseline u klicama rotkvice

Feruličnu kiselinu zabilježili smo i prije i poslije hidrolize (Slika 20 A i B), što upućuje na to da je u klicama rotkvice prisutna i u slobodnom i u derivatiziranom obliku. S obzirom da je znatno viša koncentracija bila nakon hidrolize, zaključujemo da je veći dio ove kiseline derivatiziran. Niti jedan tretman nije značajno promijenio koncentraciju ove kiseline, jedino što smo primijetili jest da su u nehidroliziranim uzorcima sve tri koncentracije salicilne kiseline pokazale tendenciju smanjenja koncentracije ferulične kiseline (Slika 20 A), no ta promjena nije bila statistički značajna. Isto tako, u hidroliziranim uzorcima primijetili smo da je koncentracija ferulične kiseline bila obrnuto proporcionalna koncentraciji primijenjene otopine natrijeva klorida (Slika 20 B), iako ni te promjene nisu bile statistički značajne na razini  $p \leq 0,05$ . Ovi rezultati ukazuju na to da se koncentraciju ferulične kiseline u klicama rotkvice ne može značajno promijeniti upotrebom primijenjenih koncentracija navedenih elicitora. Za usporedbu, kod tolerantnih varijeteta riže primijećeno je da koncentracija ferulične kiseline raste porastom intenziteta solnog stresa, dok kod susceptibilnih varijeteta ferulična kiselina uopće nije detektirana (Minh i sur., 2016), što je dovelo do zaključka da je ferulična kiselina najvjerojatnije uključena u mehanizam/me otpornosti riže na solni stres.

#### **4.2.10.3. Utjecaj elicitora na udio kavene kiseline u klicama rotkvice**

Na koncentraciju kavene kiseline u klicama rotkvice značajno je utjecao samo tretman najvišom koncentracijom salicilne kiseline (0,5 mg/mL), povisio ju je (Slika 21 A). S obzirom da je prethodno spomenuta ferulična kiselina zapravo metilirani oblik kavene, činjenica da se njena koncentracija nije promijenila pod tretmanom hormonom stresa (salicilnom kiselinom), govori nam da metoksi skupina unutar ferulične kiseline osigurava dodatnu stabilnost u odnosu na tretman hormonom stresa. Nakon hidrolize zabilježili smo slične koncentracije kavene kiseline u odnosu na one u nehidroliziranih uzoraka (Slika 21 B), što znači da je ova kiselina u klicama rotkvice zastupljena u slobodnom i derivatiziranom obliku u sličnom omjeru. Primijetili smo da je koncentracija kavene kiseline u nehidroliziranim uzorcima bila proporcionalna koncentraciji primijenjene otopine salicilne kiseline (Slika 21 A), na temelju čega zaključujemo da kavena kiselina sudjeluje u mehanizmu/ima obrane rotkvice tijekom povećane koncentracije hormona stresa. Kao i kod ferulične, i ovdje smo zamijetili da je koncentracija kavene kiseline nakon hidrolize bila obrnuto proporcionalna koncentraciji primijenjene otopine natrijeva klorida (Slika 21 B), ali bez značajnih promjena u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovakav rezultat ukazuje na negativan učinak povećane koncentracije natrijeva klorida na zastupljenost kavene i ferulične kiseline u klicama rotkvice.

#### **4.2.10.4. Utjecaj elicitora na udio klorogenske kiseline u klicama rotkvice**

Klorogenska kiselina bila je zastupljena s vrlo sličnim koncentracijama u hidroliziranim i nehidroliziranim uzorcima, kontrolna skupina sadržavala je 414,59 mg/kg SM prije, te 410,59 mg/kg SM nakon hidrolize, što znači da su slobodni i derivatizirani oblici prisutni u sličnom omjeru (Slika 22 A i B). Značajne promjene koncentracije primijetili smo u



nehidroliziranim uzorcima, naime, tretman natrijevim kloridom koncentracije 10 mg/mL uzrokovao je smanjenje koncentracije klorogenske kiseline, dok je tretman saharozom koncentracije 1 mg/mL uzrokovao porast koncentracije ove kiseline. Također, koncentracija klorogenske kiseline u klicama bila je obrnuto proporcionalna koncentraciji primijenjenog natrijeva klorida, što sugerira osjetljivost ove fenolne kiseline u rotkvici na solni stres. S obzirom da nakon hidrolize nismo uočili promjene koncentracije ove kiseline, zaključujemo da solni stres djeluje na slobodnu klorogensku kiselinu, a ne na njene derivate (Slika 22 A). Isto je tako djelovala i saharoza 1 mg/mL, samo u suprotnom smjeru, naime, povećala je koncentraciju slobodne klorogenske kiseline, ali nije utjecala na njene derivate (Slika 22 B). Zaključujemo da skupine koje su vezane na klorogensku kiselinu stabiliziraju njenu koncentraciju u rotkvici spram solnog i osmotskog stresa.

#### 4.2.10.5. Utjecaj elicitora na udio salicilne kiseline u klicama rotkvice

Tretman salicilnom kiselinom rezultirao je najznačajnijom promjenom koncentracije pojedinačnog spoja – salicilne kiseline (Slika 23 A i B). Naime, i prije i nakon hidrolize jasno je uočljivo da je koncentracija salicilne kiseline u klicama rasla paralelno s koncentracijom egzogeno dodane salicilne, što je i bilo za očekivati. Ovakav rezultat jasno ukazuje na klasičan „*source-sink*“ prijenos tvari iz mjesta više na mjesto manje koncentracije. Klice rotkvice apsorbirale su salicilnu kiselinu proporcionalno dodanoj koncentraciji. Pretpostavljamo da do *de novo* sinteze nije došlo. Činjenica da smo nakon hidrolize zabilježili znatno veću koncentraciju slobodne salicilne kiseline nego prije hidrolize govori nam da je dio iste nakon apsorpcije u klicama očito derivatiziran. To je i za očekivati jer je slobodna salicilna u velikoj koncentraciji otrovna za biljku i ona ju zato derivatizira kako bi ju "neutralizirala" i spremila u vakuolu do trenutka kad će joj biti potrebna u aktivnom, slobodnom, obliku. Jedan od oblika derivatizacije jest metilacija

prilikom čega nastaje metil-salicilat koji služi kao transportni oblik salicilne kiseline na veću udaljenost kroz biljku (Lovelock i sur., 2016; Ludwig-Müller i sur., 2015). Ono što smo još zamijetili nakon hidrolize jest rast salicilne kiseline u klicama proporcionalno upotrebljenoj koncentraciji natrijeva klorida, što i ovdje sugerira o koncentraciji-proporcionalnoj osjetljivosti klica rotkvice na solni stres. Isto tako, i prije i nakon hidrolize, koncentracija salicilne kiseline u klicama znatnije je porasla nakon tretmana natrijevim kloridom nego saharozom, na temelju čega zaključujemo da su klice rotkvice osjetljivije na solni od stresa uzrokovanog povećanom koncentracijom saharoze.

#### **4.2.10.6. Utjecaj elicitora na udio sinapinske kiseline u klicama rotkvice**

Na koncentraciju sinapinske kiseline značajno nije utjecao niti jedan od tretmana, ni u nehidroliziranim niti u hidroliziranim uzorcima (Slika 24 A i B). Primijetili smo da je koncentracija ove kiseline višestruko veća nakon hidrolize, što sugerira da je većim dijelom u klicama rotkvice zastupljena u derivatiziranom/im obliku/cima, a ne slobodnom. Uočili smo da je koncentracija ove kiseline obrnuto proporcionalna koncentraciji primijenjenog natrijevog klorida, te da najviša koncentracija ovog elicitora (10 mg/mL) pokazuje tendenciju povećanja slobodnog oblika sinapinske kiseline i tendenciju smanjenja njenog/ih derivata, što upućuje na potencijalnu ulogu slobodne sinapinske kiseline u obrani od prevelikog saliniteta u okolišu.

#### **4.2.11. Utjecaj elicitora na koncentraciju *L*-askorbinske kiseline u klicama rotkvice**

U kontrolnoj skupini klica rotkvice zabilježili smo 1,76 g/kg SM *L*-askorbinske kiseline prije hidrolize, te 1,20 g/kg SM nakon hidrolize (Slika 25 A i B). Ovo su nešto niže vrijednosti od onih zabilježenih u klicama brokule (Pérez-Balibrea i sur., 2011), međutim,

ovi su autori koristili drugačije ekstrakcijsko otapalo pa precizna usporedba rezultata nije moguća. Koncentracija ovog vitamina nije se značajno mijenjala u nehidroliziranim uzorcima (Slika 25 A), no zato smo nakon hidrolize uočili značajan porast nakon tretmana najvišom koncentracijom saharoze (Slika 25 B). Ovo je bilo i za očekivati s obzirom da je saharoza ključni faktor u biosintetskom putu *L*-askorbinske kiseline (Nishikawa i sur., 2005; Pérez-Balibrea i sur., 2011). Uz to, različite koncentracije natrijeva klorida i saharoze djelovale su u suprotnom smjeru na ovaj vitamin. Naime, koncentracija *L*-askorbinske kiseline bila je proporcionalna koncentraciji primijenjene saharoze, ali obrnuto proporcionalna koncentraciji primijenjenog natrijevog klorida. Ovakav rezultat ukazuje nam na suprotne mehanizme djelovanja solnog i stresa saharozom na *L*-askorbinsku kiselinu u klicama rotkvice. Slično našem rezultatu, Guo i sur. (2011a) objavili su da se udio *L*-askorbinske kiseline u klicama brokule značajno povećao tretmanima saharozom.

Što se tiče utjecaja salicilne kiseline, nismo uočili značajne promjene, već samo tendenciju blagog porasta *L*-askorbinske kiseline. Sličan rezultat zabilježili su i Pérez-Balibrea i sur. (2011) u radu na klicama brokule. Naime, iako su koristili drugačiji način aplikacije elicitora, sprejali su klice otopinama, a ne inkubirali ih u otopinama kao mi u našem radu, uočili su tendenciju ili čak i značajan porast koncentracije *L*-askorbinske kiseline (ovisno o koncentraciji primijenjene salicilne). Rezultati našeg i istraživanja u spomenutom radu pokazali su da ne postoji statistički značajna razlika udjela *L*-askorbinske kiseline između upotrijebljenih koncentracija salicilne kiseline, stoga su tretmani i manjim koncentracijama dovoljni za postizanje istog učinka. Guo i sur. (2013) zabilježili su značajan pad udjela *L*-askorbinske kiseline u klicama brokule tretiranim različitim koncentracijama natrijeva klorida (40-160 mM), a našim smo eksperimentalnim radom utvrdili da u klicama rotkvice tretiranim natrijevim kloridom ne dolazi do pada koncentracije ovog vitamina, štoviše, tretmani nižim koncentracijama pokazali su tendenciju povećanja količine ovog vitamina.

### 4.3. Utjecaj elicitora na potencijal klica rotkvice da inhibiraju enzim $\alpha$ -glukozidazu

Poznato je da ekstrakti i/ili pojedinačni spojevi nekih biljnih vrsta utječu na aktivnost enzima ključnih u razvoju određenih bolesti kod čovjeka. Primjerice, ekstrakt listova crvenog gloga (*Crataegus oxyacantha*), korijena gipsofile (*Gypsophila oldhamiana*), listova miloduha (*Hyssopus officinalis*), korijena batata (*Ipomoea batatas*), listova mažurana (*Origanum majorana*), kore borova (*Pinus*) te ploda dugog papra (*Piper longum*) inhibiraju aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze (Kumar i sur., 2011), jednog od ključnih enzima kod razvoja dijabetesa tipa 2. S obzirom da su različiti *in vivo* i *in vitro* eksperimenti pokazali pozitivne učinke ekstrakta korijena rotkvice (Shukla i sur., 2011), gomolja (Taniguchi i sur., 2007), klica (Taniguchi i sur., 2006), listova (Kim i sur., 2014) i sjemenki (Abed i sur., 2015; Ahmed i sur., 2016) u liječenju dijabetesa, zanimalo nas je možemo li upotrebom elicitora povećati inhibitornu aktivnost klica rotkvice spram  $\alpha$ -glukozidaze. U usporedbi s kontrolnom skupinom klica, tretirane saharozom koncentracije 0,1 mg/mL te salicilnom kiselinom koncentracija 0,01 mg/mL i 0,5 mg/mL pokazale su značajno veći stupanj inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze. Štoviše, klice tretirane salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL najintenzivnije su inhibirale aktivnost enzima  $\alpha$ -glukozidaze, 78,30%. Sposobnost salicilne kiseline da inhibira  $\alpha$ -glukozidazu nedavno su objavili Chen i sur. (2019); naime, pokazali su efikasnost različitih derivata salicilne kiseline u stvaranju vodikovih veza s  $\alpha$ -glukozidazom pri čemu nastaje kompleks SA- $\alpha$ -glukozidaza i dolazi do inhibicije tog enzima. S obzirom da su klice rotkvice tretirane salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL apsorbirale značajnu količinu ovog spoja i posljedično ga sadržavale puno više od ostalih klica (Slika 23 A i B), pretpostavljamo da je u našem eksperimentu to bio jedan od razloga povećane inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze nakon tretmana salicilnom kiselinom.

#### 4.4. Utjecaj elicitora na antioksidacijski kapacitet klica rotkvice

Ukupan antioksidacijski kapacitet biljke ovisi o mnogo različitih faktora, stoga je važno koristiti više različitih metoda za mjerenje kako bi se obuhvatilo različite tipove antioksidansa i načine njihova djelovanja (Magalhaes i sur., 2008). Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta u grubo dijelimo u dvije kategorije: metode temeljene na reakciji prijenosa atoma vodika (HAT, eng. *Hydrogen Atom Transfer*) i metode temeljene na reakciji prijenosa elektrona (SET, eng. *Single Atom Transfer*). Od metoda SET najčešće se koriste Trolox ekvivalent metode (TEAC, eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) te metoda FRAP (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*), a najpoznatija metoda HAT je ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Mi smo u sklopu ovog rada koristili metode ABTS (TEAC metoda), FRAP i ORAC. Metoda ABTS izdvojila je kao značajnije bolje antioksidanse ekstrakte klica tretiranih natrijevim kloridom i saharozom 1 mg/mL (Slika 27). S obzirom da radikal  $ABTS^{•+}$  reagira i s hidrofilnim i s lipofilnim spojevima, pretpostavljamo da su u klicama tretiranim natrijevim kloridom i saharozom 1 mg/mL prisutne veće koncentracije oba tipa antioksidansa. Metoda ORAC izdvojila je klice tretirane natrijevim kloridom i salicilnom kiselinom koncentracije 0,1 mg/mL kao značajno bogatije antioksidansima u odnosu na kontrolne klice, dok metodom FRAP nismo zabilježili povećanje antioksidacijskog djelovanja niti jednim tretmanom. Nepodudarnost rezultata između tri navedene metode očekivana je s obzirom da se međusobno razlikuju po mehanizmima reakcija i svaka daje informaciju o antioksidacijskom djelovanju na temelju drugačijeg kriterija (Magalhaes i sur., 2008).

#### 4.5. Analiza glavnih komponenata, hijerarhijsko klasteriranje i Pearsonovi koeficijenti korelacije

Kako bismo pojednostavili prikaz svih rezultata, proveli smo analizu glavnih komponenata i reducirali set podataka na dvije glavne komponente (PC1 i PC2). Set podataka koje smo uvrstili u analizu uključivao je skupine spojeva, individualne spojeve u nehidroliziranim i hidroliziranim uzorcima, fotosintetske pigmente, antioksidacijski kapacitet i aktivnost spram enzima  $\alpha$ -glukozidaze kako bismo vizualizirali stupanj (ne)ovisnosti ovih varijabli o pojedinom elicitoru, te odnose između uzoraka, tj. stupanj njihove sličnosti/različitosti. Uzorci, tj. parametri koji su slični grupirali su se, dok su oni različiti bili međusobno udaljeni. S obzirom na izmjerene parametre, tretmani koji su najviše promijenili klice rotkvice u odnosu na kontrolu bili su salicilna kiselina koncentracije 0,5 mg/mL i natrijev klorid koncentracije 1 mg/mL na temelju PC 1, te tretmani natrijevim kloridom i saharozom koncentracija 10 mg/mL na temelju PC 2, te su se oni odvojili od grupe uzoraka koju su činile kontrolne klice i one tretirane ostalim elicitorima (Slika 30 A). Prve dvije komponente objasnile su 56,85% ukupne varijabilnosti (36,21% PC1 i 20,64% PC2).

Fotosintetski pigmenti, salicilna i kavena kiselina, te ABTS vrijednost antioksidacijskog kapaciteta bili su najvarijabilniji parametri za PC 1, a ferulična kiselina u hidroliziranim uzorcima, te klorogenska kiselina i kempferol-glukozid u hidroliziranim uzorcima bili su najvarijabilniji parametri za PC 2 (Slika 30 B). Jasno je uočljivo da su tretman natrijevim kloridom 1 mg/mL i svi fotosintetski pigmenti, osim  $\beta$ -karotena, smješteni u lijevom donjem dijelu dijagrama, što nam govori da postoji visok stupanj korelacije između ovog tretmana i spomenutih parametara u klicama rotkvice. Isto tako vidimo da se tretman najvišom koncentracijom salicilne kiseline (0,5 mg/mL) podudara sa zastupljenošću salicilne kiseline i u nehidroliziranim i u hidroliziranim uzorcima klica, s benzojevom kiselinom u

hidroliziranim uzorcima, te kavenom i sinapinskom kiselinom i kvercetinom u nehidroliziranim uzorcima. Nadalje, tretman salicilnom kiselinom koncentracije 0,01 mg/mL najbliže je kontrolnoj skupini klica, što sugerira da se na temelju izmjerenih parametara najmanje razlikuje od kontrolnih klica i ne bismo ga preporučili za „poboljšanje“ spomenutih svojstava klica rotkvice. Također, parametri koji su bili najbliže kontrolnoj skupini klica ukupni su fenoli i kempferol-rutinozid (u nehidroliziranim uzorcima), dakle, u odnosu na ostale parametre, na njihov udio u klicama primijenjeni su elicitori najmanje djelovali, tj. možemo reći da su bili najstabilniji. Vrijednost inhibicije aktivnosti enzima  $\alpha$ -glukozidaze smještena je bliže tretmanima salicilnom kiselinom koncentracija 0,1 i 0,5 mg/mL, što sugerira pozitivnu korelaciju ovih tretmana i inhibicije spomenutog enzima. Zanimljivo je da su se sve tri koncentracije saharoze grupirale, dok su različite koncentracije natrijeva klorida i salicilne kiseline bile međusobno udaljene. Ovo nam govori da je, između tri testirana elicitora, utjecaj saharoze na klice rotkvice najmanje ovisio o primijenjenoj koncentraciji (najmanja je razlika između njene tri koncentracije), dok je utjecaj natrijeva klorida i salicilne kiseline značajnije ovisio o njihovim koncentracijama.

S obzirom da šećeri djeluju kao primarni glasnici u procesima prijenosa signala u svim fazama životnog ciklusa biljke (Rolland i sur., 2002) i promjene njihove koncentracije mogle bi određivati sudbinu stanice, očekivali smo da će se tretmani različitim koncentracijama saharoze značajnije separirati, no to nije bio slučaj. Pretpostavljamo da bi jedan od mogućih razloga mogla biti ograničena mogućnost apsorpcije i prijenosa molekula saharoze kroz stijenku i membranu stanica klica. Naime, u odnosu na jedinku natrijeva klorida i molekulu salicilne kiseline, saharoza je značajno veća molekula i za njen je prijenos vjerojatno potrebno uložiti više energije nego za prijenos natrijeva klorida ili salicilne kiseline. Primijetili smo i da su koncentracije salicilne kiseline od 0,01 mg/mL i 0,1 mg/mL na dijagramu bile međusobno, kao i kontrolnoj skupini klica, bliže, a koncentracija 0,5 mg/mL

udaljenija, što nam govori da su niže koncentracije sličnije i „blaže“ utjecale na klice, a najviša koncentracija uzrokovala je značajnije promjene. S obzirom da su tri koncentracije natrijeva klorida bile međusobno najudaljenije, zaključujemo da se učinak ovog elicitora na klice rotkvice najznačajnije mijenja u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji.

Još jedan od multivarijantnih tipova analiza podataka jest hijerarhijsko klasteriranje; ova analiza rezultira dendrogramom koji na jednostavan način vizualizira odnose između pojedinih uzoraka, u našem slučaju kontrolne i svih elicitorima tretiranih skupina klica rotkvice. Na Slici 31 jasno je vidljivo da je skupina tretirana salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL najudaljenija od kontrolne, a i ostalih skupina, što nam sugerira da je ovaj tretman, kada uzmemo u obzir sve parametre koje smo mjerili tijekom ovog istraživanja, najznačajnije promijenio fitokemijski sastav klica rotkvice. S druge strane, tretman salicilnom kiselinom najniže koncentracije (0,01 mg/mL) najbliže je kontrolnoj skupini klica, što znači da je najmanje utjecao na spomenute parametre klica.

Odnose između pojedinih parametara u klicama analizirali smo koristeći Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ). To je mjera za jačinu i smjer povezanosti dviju varijabli, njime se procjenjuje postoji li statistički značajan linearan odnos između dvije varijable unutar populacije. Pozitivna vrijednost koeficijenta korelacije znači da dvije varijable zajedno rastu ili padaju, a negativna vrijednost znači da dok jedna varijabla raste, druga istovremeno pada i obrnuto. Rezultati su pokazali da između spektrofotometrijski izmjerenih skupina spojeva u klicama rotkvice snažna pozitivna korelacija postoji samo između ukupnih proteina i šećera. Suprotno, ukupni flavonoidi negativno su korelirali s ukupnim šećerima, proteinima i proantocijanidinima.

Među pojedinačnim spojevima identificiranim i kvantificiranim metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja u nehidroliziranim ekstraktima pozitivno su korelirali kvercetin-glukozid i rutinozid, salicilna s kavenom kiselinom, te kvercetin i



kempferol-rutinozid. U hidroliziranim uzorcima pozitivno su korelirali kvercetin i kvercetin-diglukozid, kavena kiselina s kvercetinom i kvercetin-diglukozidom, te salicilna i benzojeva kiselina. Stupanj inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze pozitivno je korelirao s kavenom i salicilnom kiselinom u nehidroliziranim uzorcima, te s benzojevom, salicilnom i sinapinskom kiselinom u hidroliziranim uzorcima, što upućuje na zaključak da su upravo ove kiseline najznačajnije doprinijele inhibiciji  $\alpha$ -glukozidaze u ekstraktima klica rotkvice.

Među fotosintetskim pigmentima, klorofil *a* i *b* međusobno su pozitivno korelirali, kao i s ukupnim klorofilima. Likopen je pozitivno korelirao i s pojedinačnim i s ukupnim klorofilima, no negativno s  $\beta$ -karotenom, što znači da, ako će u klicama rotkvice rasti koncentracija likopena, padat će koncentracija  $\beta$ -karotena i obrnuto. Isto tako, ukoliko raste koncentracija likopena, rast će i koncentracija klorofila u klicama. Zato je nužno provesti bar dvije različite antioksidacijske metode kako bi informacija o antioksidacijskom djelovanju biljke bila potpunija.

## 5. ZAKLJUČAK

Svaki od tri tipa testiranih elicitora uzrokovao je drugačiji metabolički odgovor klica rotkvice. Štoviše, odgovori su bili specifični čak i u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji pojedinog elicitora. Najintenzivnije promjene pojedinih parametara uočili smo nakon tretmana klica natrijevim kloridom koncentracija 1 mg/mL i 10 mg/mL, te salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL. Naime, natrijev klorid koncentracije 1 mg/mL značajno je povećao udio klorofila *a* i *b*, likopena i ukupnih fotosintetskih pigmenata, koncentraciju kvercetin-rutinozida, te antioksidacijski kapacitet klica izmjeren metodom ABTS. Ovaj tretman ujedno je rezultirao i povećanom biomasom klica. Natrijev klorid koncentracije 10 mg/mL značajno je povećao udio ukupnih flavonoida, koncentraciju kempferola (dominantnog flavonoida u klicama rotkvice) i njegova glukozida, te kvercetin-rutinozida, dok je salicilna kiselina koncentracije 0,5 mg/mL značajno obogatila klice rotkvice ukupnim proteinima i šećerima, benzojevom, kavenom i salicilnom kiselinom, te je povećala stupanj inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze ekstraktima klica.

Rezultati u sklopu ovog rada doprinose boljem razumijevanju metaboličke prilagodbe biljke na kemijske elicitore različite prirode, te pružaju uvid u mogućnost iskorištavanja elicitora za poboljšanje biopotencijala biljke, u ovom slučaju klica rotkvice. Ovakav tip induciranja promjene fitokemijskog sastava i antioksidacijskog potencijala biljke mogao bi imati i ekološko značenje, naime, biljke poboljšanog fitokemijskog i antioksidacijskog profila mogle bi biti otpornije na različite bolesti. Stoga na temelju dobivenih rezultata, kao nastavak ovog istraživanja predlažemo analizu otpornosti rotkvice tretiranih natrijevim kloridom koncentracija 1 i 10 mg/mL ili salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL spram određenih patogena. Naime, od devet testiranih, ova tri tretmana najviše su doprinijela promjeni fitokemijskog profila klica rotkvice. Ovakvi rezultati, između ostalih, mogu poslužiti i kao baza razvoju programa za suvremeni uzgoj biljaka dodane vrijednosti.

## 6. ZAHVALE

*Srdačno se zahvaljujemo našoj mentorici, doc. dr. sc. Ivani Šola, na ukazanom povjerenju, strpljenju i mnogobrojim korisnim savjetima koje ćemo zasigurno moći primijeniti u budućoj znanstvenoj karijeri. Posebice želimo naglasiti i važnost njena doprinosa prilikom provedbe i pisanja samoga rada te pruženoj mogućnosti kontinuirane diskusije o svim nedoumicama na koje smo naišli.*

*Želimo se također zahvaliti i svom osoblju Botaničkog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta na dostupnosti i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada. Njihova prisutnost i ugodna atmosfera omogućili su da izrada ovoga rada bude vrlo pozitivno iskustvo koje će svima ostati u lijepom sjećanju.*

*Zaključno, zahvaljujemo se svima koji su nam bili podrška i s kojima smo tijekom cijele godine mogli raspravljati o rotkvicama.*

## 7. LITERATURA

- Abdou, I. A., Abou-Zeid, A. A., El-Sherbeeney, M. R., Abou-El-Gheat, Z. H. (1972). Antimicrobial activities of *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* on bacteria. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 22(1), 29-35.
- Abed, S. A., El-Shazely, M. O., Ahmed, K. A., Abdel-mawla, E. M., Ibrahim, A. K. (2015). Pathological, immunohistochemical and biochemical studies on the therapeutic effect of *Raphanus sativus* oil on streptozotocin induced diabetic rats. *Egyptain Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology*, 28(1), 1-17.
- Abney, K., Kopsell, D. (2009). Carotenoid concentrations in Brassicaceae sprouts do not differ among genotypes. In: *HORTSCIENCE* (Vol. 44, No. 4, pp. 1158-1158). 113 S West St, Ste 200, Alexandria, VA 22314-2851 USA: *Amer Horticultural Science*.
- Ahmed, O. M., Abdel-Reheim, E. S., Ashour, M. B., Fahim, H. I., Mohamed, H. H. (2016). Efficacies of *Eruca sativa* and *Raphanus sativus* seeds' oils in streptozotocin induced diabetic rats. *International Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2(1), 34-43.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., Rafiqzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Ann, B. M., Devesh, S., & Gothandam, K. M. (2011). Effect of salt stress on expression of carotenoid pathway genes in tomato. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7(3).
- Apostolidis, E., Kwon, Y. I., Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 8(1), 46-54.
- Ayala-Astorga, G. I., Alcaraz-Meléndez, L. (2010). Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments, and proline in *Paulownia imperialis* (Siebold Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann Hemsley) grown *in vitro*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(5), 13-14.
- Ann, B. M., Devesh, S., Gothandam, K. M. (2011). Effect of salt stress on expression of carotenoid pathway genes in tomato. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 7(3).
- Baenas, N., Moreno, D. A., García-Viguera, C. (2012). Selecting sprouts of Brassicaceae for optimum phytochemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(45), 11409-11420.
- Baenas, N., García-Viguera, C., Moreno, D. A. (2014). Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in Brassicaceae sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(8), 1881-1889.

- Baenas, N., Piegholdt, S., Schloesser, A., Moreno, D. A., García-Viguera, C., Rimbach, G., Wagner, A. E. (2016). Metabolic activity of radish sprouts derived isothiocyanates in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 251.
- Baenas, N., Gómez-Jodar, I., Moreno, D. A., García-Viguera, C., Periago, P. M. (2017). Broccoli and radish sprouts are safe and rich in bioactive phytochemicals. *Postharvest Biology and Technology*, 127, 60-67.
- Bailey-Serres, J., Parker, J. E., Ainsworth, E. A., Oldroyd, G. E., Schroeder, J. I. (2019). Genetic strategies for improving crop yields. *Nature*, 575(7781), 109-118.
- Balasubramanian, M., Anbumegala, M., Surendran, R., Arun, M., Shanmugam, G. (2018). Elite hairy roots of *Raphanus sativus* (L.) as a source of antioxidants and flavonoids. *3 Biotech*, 8(2), 128.
- Banihani, S. A. (2017). Radish (*Raphanus sativus*) and diabetes. *Nutrients*, 9(9), 1014.
- Barillari, J., Cervellati, R., Costa, S., Guerra, M. C., Speroni, E., Utan, A., Iori, R. (2006). Antioxidant and choleric properties of *Raphanus sativus* L. sprout (Kaiware Daikon) extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9773-9778.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1999). Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: The FRAP assay and its modification for measurement of ascorbic acid (FRASC). *Methods in Enzymology*, 299, 15-27.
- Biswal, B. (1995). Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 30(1), 3-13.
- Bonjoch, N. P., Tamayo, P. R. (2001). Protein content quantification by Bradford method. In: *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*, (Eds. Reigosa Roger, M. J). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 283-295.
- Borghesi, E., González-Miret, M. L., Escudero-Gilete, M. L., Malorgio, F., Heredia, F. J., Meléndez-Martínez, A. J. (2011). Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11676-11682.
- Broadhurst, C. L., Polansky, M. M., Anderson, R. A. (2000). Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 849-852.
- Broeckling, C. D., Huhman, D. V., Farag, M. A., Smith, J. T., May, G. D., Mendes, P., ... Sumner, L. W. (2005). Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 56(410), 323-336.



- Brownell, P. F., Bielig, L. M. (1996). The role of sodium in the conversion of pyruvate to phosphoenolpyruvate in mesophyll chloroplasts of C<sub>4</sub> plants. *Functional Plant Biology*, 23(2), 171-177.
- Castrejón, A. D. R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L. W., Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109(3), 564-572.
- Cevallos-Casals, B. A., Cisneros-Zevallos, L. (2010). Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*, 119(4), 1485-1490.
- Chandrasekara, A. (2019). Phenolic acids. In: Encyclopedia of Food Chemistry, (Eds. Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P.), Academic Press, Oxford, UK, pp. 535–545.
- Chang, X., Lu, Y., Lin, Z., Qiu, J., Guo, X., Pan, J., Abbasi, A. M. (2018). Impact of leaf development stages on polyphenolics profile and antioxidant activity in *Clausena lansium* (Lour.) Skeels. *BioMed Research International*, 2018.
- Chen, J., Lu, W., Chen, H., Bian, X., Yang, G. (2019). A new series of salicylic acid derivatives as non-saccharide  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and antioxidants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(2), 231-246.
- Cheplick, S., Sarkar, D., Bhowmik, P., Shetty, K. (2015). Phenolic bioactives from developmental stages of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) for hyperglycemia management using *in vitro* models. *Canadian Journal of Plant Science*, 95(4), 653-662.
- Cho, H. Y., Son, S. Y., Rhee, H. S., Yoon, S. Y. H., Lee-Parsons, C. W., Park, J. M. (2008). Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 135(1), 117-122.
- Chung, I. M., Rekha, K., Rajakumar, G., Thiruvengadam, M. (2016). Production of glucosinolates, phenolic compounds and associated gene expression profiles of hairy root cultures in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*). *3 Biotech*, 6(2), 175.
- Collins, J. K., Perkins-Veazie, P., Roberts, W. (2006). Lycopene: from plants to humans. *HortScience*, 41(5), 1135-1144.
- Cornelis, M. C., El-Soheby, A., Campos, H. (2007). GSTT1 genotype modifies the association between cruciferous vegetable intake and the risk of myocardial infarction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(3), 752-758.
- da Silva, D. F., Cipriano, P. E., de Souza, R. R., Júnior, M. S., Faquin, V., de Souza Silva, M. L., Guilherme, L. R. G. (2020). Biofortification with selenium and implications in the

- absorption of macronutrients in *Raphanus sativus* L. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103382.
- de Azevedo, C. H., Rodriguez-Amaya, D. B. (2005). Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(4), 591-597.
- Di Stefano, R., Guidoni, S. (1989). The analysis of total polyphenols in musts and wines. *Vignevini*, 1(2), 47-52.
- Doblado, R., Frías, J., Vidal-Valverde, C. (2007). Changes in vitamin C content and antioxidant capacity of raw and germinated cowpea (*Vigna sinensis* var. *carilla*) seeds induced by high pressure treatment. *Food Chemistry*, 101(3), 918-923.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Elsheery, N. I., Cao, K. F. (2008). Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(6), 769-777.
- Figuroa-Pérez, M. G., Gallegos-Corona, M. A., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R. (2015). Salicylic acid elicitation during cultivation of the peppermint plant improves anti-diabetic effects of its infusions. *Food Function*, 6(6), 1865-1874.
- Filimon, R., Rotaru, L., Filimon, R., Niculaua, M. (2015). Anthocyanin content and composition of red senescent leaves from *Vitis vinifera* L. Table Grape Cultivars. In: Horticultură, Viticultură și vinificație, Silvicultură și grădini publice, Protecția plantelor (Eds. Cimpoeș, G.), Universitatea Agrară de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova, pp. 82-92.
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., & Oteiza, P. I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 435-445.
- Fraire-Velázquez, S., & Balderas-Hernández, V. E. (2013). In: Abiotic Stress—Plant Responses and Applications in Agriculture. (Eds. Vahdati, K., Leslie, C.), InTech, Rijeka, Croatia.
- Furlan, C. M., Barbosa, L., Alves, D. Y. (2011). Tannins: what do they represent in plant life. In: Tannins: Types, Foods Containing and Nutrition. (Ed. Petridis, G. K.), Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, pp. 251-263.

- Gangopadhyay, M., Dewanjee, S., Bhattacharya, S. (2011). Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago indica* hairy root cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(6), 706-710.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., ... Pugin, A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 711-724.
- García-Pastor, M. E., Zapata, P. J., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valero, D., Serrano, M. (2020). The effects of salicylic acid and its derivatives on increasing pomegranate fruit quality and bioactive compounds at harvest and during storage. *Frontiers in Plant Science*, 11, 668.
- Gavaghan, C. L., Li, J. V., Hadfield, S. T., Hole, S., Nicholson, J. K., Wilson, I. D., ... Holmes, E. (2011). Application of NMR-based metabolomics to the investigation of salt stress in maize (*Zea mays*). *Phytochemical Analysis*, 22(3), 214-224.
- Gonçalves, S., Romano, A. (2017). Inhibitory properties of phenolic compounds against enzymes linked with human diseases. In: Phenolic Compounds - Biological Activity, (Eds. Soto-Hernandez, M., Palma-Tenango, M., Garcia-Mateos, M. del R.) pp. 99-112.
- Gorham, J., Hughes, L. L., Wyn Jones, R. G. (1981). Low-molecular-weight carbohydrates in some salt-stressed plants. *Physiologia Plantarum*, 53(1), 27-33.
- Goyeneche, R., Roura, S., Ponce, A., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Uribe, E., Di Scala, K. (2015). Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus* L.) leaves and roots. *Journal of Functional Foods*, 16, 256-264.
- Guo, L., Yang, R., Wang, Z., Guo, Q., Gu, Z. (2014). Effect of NaCl stress on health-promoting compounds and antioxidant activity in the sprouts of three broccoli cultivars. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(4), 476-481.
- Guo, R. F., Yuan, G. F., Wang, Q. M. (2013). Effect of NaCl treatments on glucosinolate metabolism in broccoli sprouts. *Journal of Zhejiang University Science B*, 14(2), 124-131.
- Guo, R., Yuan, G., Wang, Q. (2011). Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 159-165.
- Guo, R., Yuan, G., Wang, Q. (2011). Sucrose enhances the accumulation of anthocyanins and glucosinolates in broccoli sprouts. *Food Chemistry*, 129(3), 1080-1087.
- Gutiérrez, R. M. P., Perez, R. L. (2004). *Raphanus sativus* (Radish): their chemistry and biology. *The Scientific World Journal*, 4.

- Haile, M., Kang, W. H. (2019). Antioxidant activity, total polyphenol, flavonoid and tannin contents of fermented green coffee beans with selected yeasts. *Fermentation*, 5(1), 29.
- Hanlon, P. R., Barnes, D. M. (2011). Phytochemical composition and biological activity of 8 varieties of radish (*Raphanus sativus* L.) sprouts and mature taproots. *Journal of Food Science*, 76(1), C185-C192.
- Hara, M., Ito, F., Asai, T., Kuboi, T. (2009). Variation in amylase activities in radish (*Raphanus sativus*) cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(3), 188-192.
- Heaney, R. K., Fenwick, G. R. (1980). Glucosinolates in Brassica vegetables. Analysis of 22 varieties of Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(8), 785-793.
- Hendry, G.A.F., Price, A.H. (1993). Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: *Methods in Comparative Plant Ecology*, (Eds. Hendry, G.A.F., Grime, J.P.), Chapman and Hall, London, UK, pp. 148–152.
- Hyun, D. H., Emerson, S. S., Jo, D. G., Mattson, M. P., De Cabo, R. (2006). Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), 19908-19912.
- Ibrahim, H. A., Abdellatif, Y. M. (2016). Effect of maltose and trehalose on growth, yield and some biochemical components of wheat plant under water stress. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(2), 267-274.
- Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R. (2009). Health-affecting compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 31-43.
- Jiao, J., Gai, Q. Y., Wang, X., Qin, Q. P., Wang, Z. Y., Liu, J., Fu, Y. J. (2018). Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 124, 28-35.
- Kaneko, Y., Matsuzawa, Y. (1993). Radish: *Raphanus sativus* L. In: *Genetic Improvement of Vegetable Crops*, (Eds. Kaloo, G., Bergh, B. O.) Pergamon Press Ltd., Oxford, UK, pp. 487-510.
- Kang, M. S., Kang, Y. R., Lee, Y., Chang, Y. H. (2018). Effect of mixed culture inoculation on chemical and sensory properties of aronia (*Aronia melanocarpa*). *Food Science and Technology*, 98, 418-423.
- Kang, Y. I., Park, J. M., Kim, S. H., Kang, N. J., Park, K. S., Lee, S. Y., Jeong, B. R. (2011). Effects of root zone pH and nutrient concentration on the growth and nutrient uptake of tomato seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 34(5), 640-652.

- Kastell, A., Smetanska, I., Ulrichs, C., Cai, Z., Mewis, I. (2013). Effects of phytohormones and jasmonic acid on glucosinolate content in hairy root cultures of *Sinapis alba* and *Brassica rapa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(2), 624-635.
- Katayama, Y., Shida, S. (1970). Studies on the change of chlorophyll *a* and *b* contents due to projected materials and some environmental conditions. *Cytologia*, 35(2), 171-180.
- Khachik, F., Beecher, G. R., Goli, M. B., Lusby, W. R., Smith Jr, J. C. (1992). Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. *Analytical Chemistry*, 64(18), 2111-2122.
- Khachik, F., Beecher, G. R., Whittaker, N. F. (1986). Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(4), 603-616.
- Khachik, F., Pfander, H., Traber, B. (1998). Proposed mechanisms for the formation of synthetic and naturally occurring metabolites of lycopene in tomato products and human serum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4885-4890.
- Kim, J. K., Bamba, T., Harada, K., Fukusaki, E., Kobayashi, A. (2007). Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 415-424.
- Kim, J. K., Baskar, T. B., Park, S. U. (2016). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of two *Raphanus sativus* L. cultivars (Cherry Belle and Valentine). *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(1), 31-36.
- Kim, M., Kim, E., Kwak, H. S., Jeong, Y. (2014). The ingredients in Saengshik, a formulated health food, inhibited the activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase as anti-diabetic function. *Nutrition Research and Practice*, 8(5), 602-606.
- King, G. A., Morris, S. C. (1994). Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(5), 1000-1005.
- Kinnula, V. L., Crapo, J. D. (2004). Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(6), 718-744.
- Kondo, S., Tsuda, K., Muto, N., Ueda, J. E. (2002). Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 96(1-4), 177-185.
- Korekar, G., Dolkar, P., Singh, H., Srivastava, R. B., Stobdan, T. (2014). Variability and the genotypic effect on antioxidant activity, total phenolics, carotenoids and ascorbic acid

- content in seventeen natural population of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) from trans-Himalaya. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 157-162.
- Kroemer, G., López-Otín, C., Madeo, F., de Cabo, R. (2018). Carbotoxicity—noxious effects of carbohydrates. *Cell*, 175(3), 605-614.
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O. (2011).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 19.
- Kundan, P., Jagdish, S., Deepak, C. (2014). Quantification of antioxidant phytochemicals in fresh vegetables using high performance liquid chromatography. *Research Journal of Phytochemistry*, 8(4), 162-167.
- Lee, M. T., Lin, W. C., Yu, B., Lee, T. T. (2017). Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals—A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(3), 299.
- Li, L., Hao, J., Song, S., Nirasawa, S., Jiang, Z., Liu, H. (2018). Effect of slightly acidic electrolyzed water on bioactive compounds and morphology of broccoli sprouts. *Food Research International*, 105, 102-109.
- Li, R., Hao, R., Zhu, Y. (2019). Steam radish sprout (*Raphanus sativus* L.): active substances, antioxidant activities and non-targeted metabolomics analysis. *International Journal of Food Science Technology*, 54(12), 3138-3148.
- Li, R., Zhu, Y. (2018). The primary active components, antioxidant properties, and differential metabolite profiles of radish sprouts (*Raphanus sativus* L.) upon domestic storage: Analysis of nutritional quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(15), 5853-5860.
- Lisar, S. Y., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M. (2012). Water stress in plants: causes, effects and responses. In: Water Stress (Eds. Prof. Rahman, I.) ISBN: 978-953-307-963-9. *Tech. doi*, 10, 39363.
- Liu, X., Lv, K. (2013). Cruciferous vegetables intake is inversely associated with risk of breast cancer: a meta-analysis. *The Breast*, 22(3), 309-313.
- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M. C., García-Viguera, C., Carvajal, M. (2008). Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli. *Plant Science*, 174(3), 321-328.
- Lovelock, D. A., Šola, I., Marschollek, S., Donald, C. E., Rusak, G., van Pée, K. H., ... Cahill, D. M. (2016). Analysis of salicylic acid-dependent pathways in *Arabidopsis thaliana* following infection with *Plasmodiophora brassicae* and the influence of salicylic acid on disease. *Molecular Plant Pathology*, 17(8), 1237-1251.

- Ludwig-Müller, J. (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology Letters*, 37(7), 1325-1334.
- Lugast, A., Hovari, J. (2000). Flavonoid aglycons in foods of plant origin I. Vegetables. *Acta Alimentaria*, 29(4), 345-352.
- Luo, J., Liu, L., Wu, C. D. (2001). Enhancement of paclitaxel production by abscisic acid in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters*, 23(16), 1345-1348.
- Ma, Q., Yue, L. J., Zhang, J. L., Wu, G. Q., Bao, A. K., Wang, S. M. (2012). Sodium chloride improves photosynthesis and water status in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Tree Physiology*, 32(1), 4-13.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
- Malik, A., Waheed, A., Qadir, G., Asghar, R. (2006). Interactive effects of irrigation and phosphorus on green gram (*Vigna radiata* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 38(4), 1119.
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 1-16.
- Mathan, J., Bhattacharya, J., Ranjan, A. (2016). Enhancing crop yield by optimizing plant developmental features. *Development*, 143(18), 3283-3294.
- Mayeaux, M., Xu, Z., King, J. M., Prinyawiwatkul, W. (2006). Effects of cooking conditions on the lycopene content in tomatoes. *Journal of Food Science*, 71(8), C461-C464.
- Manivannan, A., Kim, J. H., Kim, D. S., Lee, E. S., Lee, H. E. (2019). Deciphering the nutraceutical potential of *Raphanus sativus* - A comprehensive overview. *Nutrients*, 11(2), 402.
- Mane, A. V., Saratale, G. D., Karadge, B. A., Samant, J. S. (2011). Studies on the effects of salinity on growth, polyphenol content and photosynthetic response in *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 23(1), 59-70.
- Martinez, V., Mestre, T. C., Rubio, F., Girones-Vilaplana, A., Moreno, D. A., Mittler, R., Rivero, R. M. (2016). Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors oxidative damage protection under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 7, 838.
- Minh, L. T., Khang, D. T., Ha, P. T. T., Tuyen, P. T., Minh, T. N., Quan, N. V., Xuan, T. D. (2016). Effects of salinity stress on growth and phenolics of rice (*Oryza sativa* L.). *International Letters of Natural Sciences*, 57.
- Naik, P. M., Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors—role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives*, 247-277.

- Nampoothiri, S. V., Prathapan, A., Cherian, O. L., Raghu, K. G., Venugopalan, V. V., Sundaresan, A. (2011). *In vitro* antioxidant and inhibitory potential of *Terminalia bellerica* and *Embllica officinalis* fruits against LDL oxidation and key enzymes linked to type 2 diabetes. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 125-131.
- Natella, F., Maldini, M., Nardini, M., Azzini, E., Foddai, M. S., Giusti, A. M., ... Scaccini, C. (2016). Improvement of the nutraceutical quality of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chemistry*, 201, 101-109.
- Nishikawa, F., Kato, M., Hyodo, H., Ikoma, Y., Sugiura, M., & Yano, M. (2005). Effect of sucrose on ascorbate level and expression of genes involved in the ascorbate biosynthesis and recycling pathway in harvested broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 65-72.
- Nishino, A., Ichihara, T., Takaha, T., Kuriki, T., Nihei, H., Kawamoto, K., ... Maoka, T. (2015). Accumulation of paprika carotenoids in human plasma and erythrocytes. *Journal of Oleo Science*, 64(10), 1135-1142.
- O'Callaghan, K. J., Stone, P. J., Hu, X., Griffiths, D. W., Davey, M. R., Cocking, E. C. (2000). Effects of Glucosinolates and Flavonoids on Colonization of the Roots of Brassica napus by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2185-2191.
- Okada, Y., Okada, M., Sagesaka, Y. (2010). Screening of dried plant seed extracts for adiponectin production activity and tumor necrosis factor-alpha inhibitory activity on 3T3-L1 adipocytes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 225-232.
- Oksman-Caldentey, K. M., Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9), 433-440.
- Olsson, M. E., Ekvall, J., Gustavsson, K. E., Nilsson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., ... Nyman, M. G. (2004). Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2490-2498.
- Paiva, É. A. S., Isaias, R. M. D. S., Vale, F. H. A., Queiroz, C. G. D. S. (2003). The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. purpurea Boom (Commelinaceae) leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(4), 617-624.
- Park, C. H., Baskar, T. B., Park, S. Y., Kim, S. J., Valan Arasu, M., Al-Dhabi, N. A., ... Park, S. U. (2016). Metabolic profiling and antioxidant assay of metabolites from three radish cultivars (*Raphanus sativus*). *Molecules*, 21(2), 157.



- Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., García-Viguera, C. (2011). Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chemistry*, 129(1), 35-44.
- Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., & Tananaki, C. (2012). Salinity-induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (*Olea europaea* L.) and their relationship to antioxidant activity. *Environmental and Experimental Botany*, 79, 37-43.
- Phan, M. A. T., Wang, J., Tang, J., Lee, Y. Z., Ng, K. (2013). Evaluation of  $\alpha$ -glucosidase inhibition potential of some flavonoids from *Epimedium brevicornum*. *LWT-Food Science and Technology*, 53(2), 492-498.
- Pommerrenig, B., Junker, A., Abreu, I., Bieber, A., Fuge, J., Willner, E., ... Bienert, G. P. (2018). Identification of rapeseed (*Brassica napus*) cultivars with a high tolerance to boron-deficient conditions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1142.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11).
- Raiola, A., Errico, A., Petruk, G., Monti, D. M., Barone, A., Rigano, M. M. (2018). Bioactive compounds in Brassicaceae vegetables with a role in the prevention of chronic diseases. *Molecules*, 23(1), 15.
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 1720–1731.
- Randhir, R., Lin, Y. T., Shetty, K., Lin, Y. T. (2004). Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(3).
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rock, C. L. (2009). Carotenoids and cancer. In: Carotenoids, Volume 5: Nutrition and Health, (Eds. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H.), Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S185-S205.
- Rubilar, M., Jara, C., Poo, Y., Acevedo, F., Gutierrez, C., Sineiro, J., Shene, C. (2011). Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): sources of antioxidant compounds and  $\alpha$ -glucosidase/ $\alpha$ -amylase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1630-1637.

- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., Fernie, A. R. (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 21-34.
- Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., Silveira, D. (2012).  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141-183.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vécsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*, 257(1-2), 221-239.
- Satdive, R. K., Fulzele, D. P., Eapen, S. (2007). Enhanced production of azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization. *Journal of Biotechnology*, 128(2), 281-289.
- Scheen, A. J. (2007). Antidiabetic agents in subjects with mild dysglycaemia: prevention or early treatment of type 2 diabetes? *Diabetes Metabolism*, 33(1), 3-12.
- Shetty, P., Atallah, M. T., Shetty, K. (2002). Effects of UV treatment on the proline-linked pentose phosphate pathway for phenolics and L-DOPA synthesis in dark germinated *Vicia faba*. *Process Biochemistry*, 37(11), 1285-1295.
- Shi, M., Kwok, K. W., Wu, J. Y. (2007). Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 46(4), 191-196.
- Shukla, S., Chatterji, S., Mehta, S., Rai, P. K., Singh, R. K., Yadav, D. K., Watal, G. (2011). Antidiabetic effect of *Raphanus sativus* root juice. *Pharmaceutical Biology*, 49(1), 32-37.
- Siddiq, A., Younus, I. (2018). The Radish, *Raphanus sativus* L. Var. *caudatus* reduces anxiety-like behavior in mice. *Metabolic Brain Disease*, 33(4), 1255-1260.
- Sims, D. A., Gamon, J. A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, 81(2-3), 337-354.
- Singh, B., Usha, K. (2003). Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, 39(2), 137-141.
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Prasad, K., Bahadur, A., Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 106-112.
- Singh, P., Singh, J. (2013). Medicinal and therapeutic utilities of *Raphanus sativus*. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 3, 103-5.

- Singh, U., Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 13(3), 129-142.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178).
- Smetanska, I., Krumbein, A., Schreiner, M., Knorr, M. (2007). Influence of salicylic acid and methyl jasmonate on glucosinolate levels in turnip. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(5), 690-694.
- Story, E. N., Kopec, R. E., Schwartz, S. J., Harris, G. K. (2010). An update on the health effects of tomato lycopene. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 189-210.
- Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, 2231, 606X.
- Subbarao, G. V., Wheeler, R. M., Stutte, G. W., Levine, L. H. (1999). How far can sodium substitute for potassium in red beet? *Journal of Plant Nutrition*, 22(11), 1745-1761.
- Suzuki, Y., Shioi, Y. (2004). Changes in chlorophyll and carotenoid contents in radish (*Raphanus sativus*) cotyledons show different time courses during senescence. *Physiologia Plantarum*, 122(2), 291-296.
- Świeca, M. (2015). Elicitation with abiotic stresses improves pro-health constituents, antioxidant potential and nutritional quality of lentil sprouts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), 409-416.
- Świeca, M., Sęczyk, Ł., Gawlik-Dziki, U. (2014). Elicitation and precursor feeding as tools for the improvement of the phenolic content and antioxidant activity of lentil sprouts. *Food Chemistry*, 161, 288-295.
- Šamec, D., Piljac-Žegarac, J., Bogović, M., Habjanič, K., Grúz, J. (2011). Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae*, 128(2), 78-83.
- Šola, I., Bok, V. V., Dujmović, M., Rusak, G. (2020). Developmentally-related changes in phenolic and L-ascorbic acid content and antioxidant capacity of Chinese cabbage sprouts. *Journal of Food Science and Technology*, 57(2), 702-712.
- Taïbi, K., Taïbi, F., Abderrahim, L. A., Ennajah, A., Belkhodja, M., Mulet, J. M. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 105, 306-312.

- Takaya, Y., Kondo, Y., Furukawa, T., Niwa, M. (2003). Antioxidant constituents of radish sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8061-8066.
- Taniguchi, H., Kobayashi-Hattori, K., Tenmyo, C., Kamei, T., Uda, Y., Sugita-Konishi, Y., ... Takita, T. (2006). Effect of Japanese radish (*Raphanus sativus*) sprout (Kaiware-daikon) on carbohydrate and lipid metabolisms in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(4), 274-278.
- Taniguchi, H., Muroi, R., Kobayashi-Hattori, K., Uda, Y., Oishi, Y., Takita, T. (2007). Differing effects of water-soluble and fat-soluble extracts from Japanese radish (*Raphanus sativus*) sprouts on carbohydrate and lipid metabolism in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 53(3), 261-266.
- Tighe-Neira, R., Reyes-Díaz, M., Nunes-Nesi, A., Recio, G., Carmona, E., Corgne, A., ... Inostroza-Blancheteau, C. (2020). Titanium dioxide nanoparticles provoke transient increase in photosynthetic performance and differential response in antioxidant system in *Raphanus sativus* L. *Scientia Horticulturae*, 269, 109418.
- Tokatlidis, I. S., Koutroubas, S. D. (2004). A review of maize hybrids' dependence on high plant populations and its implications for crop yield stability. *Field Crops Research*, 88(2-3), 103-114.
- Tomasik, P., Horton, D. (2012). Enzymatic conversions of starch. In: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, (Eds. Horton, D.) Academic Press, Oxford, UK, pp. 59-436.
- Vasconsuelo, A., Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172(5), 861-875.
- Vallejo, F., García-Viguera, C., Tomás-Barberán, F. A. (2003). Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3776-3782.
- Velasco, P., Rodríguez, V. M., Francisco, M., Cartea, M. E., Soengas, P. (2016). Genetics and breeding of Brassica crops. In: *Glucosinolates*, (Eds. Mérillon, J. M., Ramawat, K. G.), Springer, Cham, Switzerland, pp. 1-26.
- Vinholes, J., Grosso, C., Andrade, P. B., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., de Pinho, P. G., Ferreres, F. (2011). *In vitro* studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. *Food Chemistry*, 129(2), 454-462.

- Walker, T. S., Bais, H. P., Vivanco, J. M. (2002). Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*, 60(3), 289-293.
- Wang, P., Ma, G., Zhang, L., Li, Y., Fu, Z., Kan, X., ... Gao, L. (2019). A sucrose-induced MYB (SIMYB) transcription factor promoting proanthocyanidin accumulation in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(5), 1418-1428.
- Williams, M., Senaratna, T., Dixon, K., Sivasithamparam, K. (2003). Benzoic acid induces tolerance to biotic stress caused by *Phytophthora cinnamomi* in *Banksia attenuata*. *Plant Growth Regulation*, 41(1), 89-91.
- Willows, R.D. (2004) Chlorophylls. In: Plant pigments and their manipulation. (Ed. Davies, K. M.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 23 – 57.
- Wu, D., Cheng, H., Chen, J., Ye, X., Liu, Y. (2019). Characteristics changes of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) during different growth stages. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 654-662.
- Xiao, J., Ni, X., Kai, G., Chen, X. (2013). A review on structure–activity relationship of dietary polyphenols inhibiting  $\alpha$ -amylase. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 497-506.
- Yu, M., Facchini, P. J. (2000). Molecular cloning and characterization of a type III glutathione S-transferase from cell suspension cultures of opium poppy treated with a fungal elicitor. *Physiologia Plantarum*, 108(1), 101-109.
- Yuan, G., Wang, X., Guo, R., Wang, Q. (2010). Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food Chemistry*, 121(4), 1014-1019.
- Zang, Y. X., Lim, M. H., Park, B. S., Hong, S. B., Kim, D. H. (2008). Metabolic Engineering of Indole Glucosinolates in Chinese Cabbage Plants by Expression of *Arabidopsis* CYP79B2, CYP79B3, and CYP83B1. *Molecules Cells (Springer Science Business Media BV)*, 25(2).
- Zhang, X., Wollenweber, B., Jiang, D., Liu, F., Zhao, J. (2008). Water deficits and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing ABP9, a bZIP transcription factor. *Journal of Experimental Botany*, 59(4), 839-848.
- Zhao, D., Hao, Z., Wang, J., Tao, J. (2013). Effects of pH in irrigation water on plant growth and flower quality in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Scientia Horticulturae*, 154, 45-53.

Zeng, J., Wang, C., Chen, X., Zang, M., Yuan, C., Wang, X., ... Li, K. (2015). The lycopene  $\beta$ -cyclase plays a significant role in provitamin A biosynthesis in wheat endosperm. *BMC plant biology*, 15(1), 112.

URL: [https://www.gardensonline.com.au/gardenshed/plantfinder/show\\_2030.aspx](https://www.gardensonline.com.au/gardenshed/plantfinder/show_2030.aspx)

## 8. SAŽETAK

---

Dorian Dragičević, Matea Eršetić i Marina Horvat

**MOGUĆNOST PRIMJENE NATRIJEVA KLORIDA, SAHAROZE I SALICILNE  
KISELINE ZA POBOLJŠANJE FITOKEMIJSKOG SASTAVA I  
ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA KLICA ROTKVICE (*Raphanus sativus* L.) TE  
NJIHOVE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE ENZIMA  $\alpha$ -GLUKOZIDAZE**

Bolje razumijevanje mogućnosti povećanja koncentracije željenih bioaktivnih spojeva, ili smanjenja neželjenih, i antioksidacijskog potencijala biljaka, kao i poboljšanja njihova inhibitorna učinka spram enzima ključnih za pojavu nekih bolesti u čovjeka važno je sa znanstvenog i ekonomskog stajališta. Primjena egzogenih stimulansa za poticanje proizvodnje željenih metabolita u biljkama sve je zastupljeniji pristup. U sklopu ovog rada istražili smo mogućnost primjene tri različita tipa elicitora, natrijeva klorida, saharoze i salicilne kiseline, za poboljšanje biopotencijala klica rotkvice. Koristili smo niz spektrofotometrijskih metoda za mjerenje udjela različitih skupina spojeva i *in vitro* određivanje stupnja inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze, tri različite spektrofotometrijske metode za procjenu antioksidacijskog kapaciteta uzoraka, metodu tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih fenolnih spojeva i *L*-askorbinske kiseline (vitamina C), te četiri tipa statističkih analiza za obradu podataka.

Tretman natrijevim kloridom koncentracije 0,1 mg/mL povećao je koncentraciju kempferola i kvercetin-glukozida, te antioksidacijski kapacitet klica mjeren metodom ORAC. Natrijev klorid koncentracije 1 mg/mL povećao je udio klorofila *a* i *b*, likopena, kao i ukupnih klorofila te fotosintetskih pigmenata (klorofila i karotenoida zajedno), te antioksidacijski kapacitet klica mjeren metodom ABTS. Najviša koncentracija natrijeva



klorida, 10 mg/mL, povećala je udio ukupnih flavonoida i kempferola. Saharozna koncentracija 0,1 mg/mL povećala je udio ukupnih proteina, a pri koncentraciji 10 mg/mL potaknula je sintezu flavonoida pa im se ukupni udio značajno povećao, između ostalih i koncentracija kempferola i kvercetin-glukozida, te koncentracija vitamina C. Salicilna kiselina koncentracije 0,1 mg/mL značajno je povećala udio ukupnih glukozinolata, proteina i šećera u klicama, te njihov antioksidacijski potencijal izmjeren metodom ORAC. Koncentracija salicilne kiseline od 0,5 mg/mL povećala je udio ukupnih proteina i šećera, koncentraciju salicilne kiseline u nehidroliziranim i hidroliziranim uzorcima, koncentraciju benzojeve kiseline u hidroliziranim uzorcima i kavene u nehidroliziranim.

Značajno smanjenje udjela ukupnih tanina, koji zbog svog precipitirajućeg djelovanja na proteine nisu poželjni spojevi u biljkama koje konzumiramo, postigli smo tretmanima natrijevim kloridom koncentracija 1 mg/mL i 10 mg/mL, saharozom koncentracije 1 mg/mL, te salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL, dok je smanjenje udjela šećera postignuto tretmanom natrijevim kloridom koncentracije 1 mg/mL.

Pojačan stupanj inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze postigli smo tretmanima saharozom koncentracije 0,1 mg/mL, te salicilnom kiselinom koncentracija 0,01 mg/mL i 0,5 mg/mL. S obzirom na izmjerene parametre, analiza glavnih komponenata (PCA) pokazala je da su tretmani koji su najviše promijenili klice rotkvice u odnosu na kontrolu bili salicilna kiselina koncentracije 0,5 mg/mL i natrijev klorid koncentracije 1 mg/mL na temelju PC 1, te tretmani natrijevim kloridom i saharozom koncentracija 10 mg/mL na temelju PC 2, te su se oni odvojili od grupe uzoraka koju su činile kontrolne klice i one tretirane ostalim elicitorima. Tretman salicilnom kiselinom koncentracije 0,01 mg/mL najbliže je kontrolnoj skupini klica, što sugerira da se na temelju izmjerenih parametara najmanje razlikuje od kontrolnih klica i ne bismo ga preporučili za općenito „poboljšanje“ spomenutih svojstava klica rotkvice. Parametri koji su bili najbliže kontrolnoj skupini klica ukupni su fenoli i

kempferol-rutinozid (u nehidroliziranim uzorcima), dakle, u odnosu na ostale parametre, na njihov udio u klicama primijenjeni su elicitori najmanje djelovali, tj. možemo reći da su bili najstabilniji. Vrijednost inhibicije aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze smještena je bliže tretmanima salicilnom kiselinom koncentracija 0,1 i 0,5 mg/mL, što sugerira pozitivnu korelaciju ovih tretmana i inhibicije spomenutog enzima. Zanimljivo je da su se sve tri koncentracije saharoze grupirale, dok su različite koncentracije natrijeva klorida i salicilne kiseline bile međusobno udaljene. Ovo nam govori da je, između tri testirana elicitora, utjecaj saharoze na klice rotkvice najmanje ovisio o primijenjenoj koncentraciji (najmanja je razlika između njene tri koncentracije), dok je utjecaj natrijeva klorida i salicilne kiseline značajnije ovisio o koncentracijama. Primijetili smo i da su koncentracije salicilne kiseline 0,01 mg/mL i 0,1 mg/mL na dijagramu bile međusobno, kao i kontrolnoj skupini klica, bliže, a koncentracija 0,5 mg/mL udaljenija, što nam govori da su niže koncentracije sličnije i „blaže“ su utjecale na klice, a najviša koncentracija uzrokovala je značajnije promjene. S obzirom da su tri koncentracije natrijeva klorida bile međusobno najudaljenije, zaključujemo da se učinak ovog elicitora na klice rotkvice najznačajnije mijenja u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji.

Metoda hijerarhijskog klasteriranja pokazala je da je skupina tretirana salicilnom kiselinom koncentracije 0,5 mg/mL najudaljenija od kontrolne, a i ostalih skupina, što nam sugerira da je ovaj tretman, kada uzmemo u obzir sve parametre koje smo mjerili, najznačajnije promijenio fitokemijski sastav klica rotkvice. S druge strane, tretman salicilnom kiselinom najniže koncentracije (0,01 mg/mL) najbliže je kontrolnoj skupini klica, što znači da je najmanje utjecao na spomenute parametre klica.

Odnose između pojedinih parametara u klicama analizirali smo koristeći Pearsonov koeficijent korelacije. Snažna pozitivna korelacija postoji između ukupnih proteina i šećera. Suprotno, ukupni flavonoidi negativno su korelirali s ukupnim šećerima, proteinima i

proantocijanidinima. U nehidroliziranim ekstraktima pozitivno su korelirali kvercetin-glukozid i rutinozid, salicilna s kavenom kiselinom, te kvercetin i kempferol-rutinozid. U hidroliziranim uzorcima pozitivno su korelirali kvercetin i kvercetin-diglukozid, kavena kiselina s kvercetinom i kvercetin-diglukozidom, te salicilna i benzojeva kiselina. Stupanj inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze pozitivno je korelirao s kavenom i salicilnom kiselinom u nehidroliziranim uzorcima, te s benzojevom, salicilnom i sinapinskom kiselinom u hidroliziranim uzorcima, što upućuje na zaključak da su upravo ove kiseline najznačajnije doprinijele inhibiciji  $\alpha$ -glukozidaze u ekstraktima klica rotkvice. Među fotosintetskim pigmentima, klorofil *a* i *b* međusobno su pozitivno korelirali, kao i s ukupnim klorofilima. Likopen je pozitivno korelirao i s pojedinačnim i s ukupnim klorofilima, no negativno s  $\beta$ -karotenom, što znači da, ako će u klicama rotkvice rasti koncentracija likopena, padat će koncentracija  $\beta$ -karotena i obrnuto, ukoliko raste koncentracija likopena, rast će i koncentracija klorofila.

**Ključne riječi:** elicitori, klice, biljni bioaktivni spojevi, antioksidansi, inhibicija enzima

## 9. SUMMARY

---

Dorian Dragičević, Matea Eršetić i Marina Horvat

**POTENTIAL OF SODIUM CHLORIDE, SUCROSE AND SALICYLIC ACID  
APPLICATION FOR IMPROVEMENT OF THE PHYTOCHEMICAL  
COMPOSITION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF RADISH (*Raphanus sativus*  
L.) SEEDLINGS, AND THEIR ABILITY TO INHIBIT  $\alpha$ -GLUCOSIDASE ENZYME**

A better understanding of the possibility to increase the concentration of desired bioactive compounds in plants, or reduce the unwanted ones, to increase the antioxidant potential, as well as to improve the inhibitory effect of their extracts toward the enzymes involved in the development of some human diseases is important from a scientific and economic point of view. The use of exogenous stimulants for the increase of the desired metabolites in plants is an increasingly common approach. In the scope of this work, we investigated the possibility of application of three different types of elicitors, sodium chloride, sucrose and salicylic acid, to improve the biopotential of radish seedlings. We used spectrophotometric methods to measure the content of different groups of compounds and for *in vitro* determination of the degree of  $\alpha$ -glucosidase inhibition, three different methods to assess the antioxidant capacity of samples, high-performance liquid chromatography method for separation, identification and quantification of individual phenolics and *L*-ascorbic acid (vitamin C), and finally four types of statistical analyses to process the data.

Treatment with 0.1 mg/mL sodium chloride increased the concentration of kaempferol and quercetin glucoside, and the antioxidant capacity of the seedlings measured by the ORAC method. Sodium chloride 1 mg/mL increased the proportion of chlorophyll *a* and *b*, lycopene, as well as total chlorophyll and photosynthetic pigments, and the antioxidant capacity measured by the ABTS method. The highest concentration of sodium chloride increased the concentration of total flavonoids and kaempferol. Sucrose 0.1 mg/mL increased the proportion

of total proteins, and at a concentration of 10 mg/mL stimulated the synthesis of flavonoids, so their total share increased significantly, including the concentration of kaempferol and quercetin glucoside, and the concentration of vitamin C. Salicylic acid 0.1 mg/mL significantly increased the proportion of total glucosinolates, proteins and sugars, and the antioxidant potential as measured by the ORAC method. Salicylic acid 0.5 mg/mL increased the proportion of total proteins and sugars, the concentration of salicylic acid in non-hydrolyzed and hydrolyzed samples, the concentration of benzoic acid in hydrolyzed samples and caffeic acid in non-hydrolyzed samples.

Significant reduction of total tannins, which due to their precipitating effect on proteins are not desirable compounds in plants that are consumed, was achieved by the treatment with sodium chloride 1 mg/mL and 10 mg/mL, sucrose 1 mg/mL, and salicylic acid 0,5 mg/mL, while a reduction in sugar content was achieved by the treatment with sodium chloride 1 mg/mL.

An increased degree of  $\alpha$ -glucosidase inhibition was achieved by the treatment with sucrose 0.1 mg/mL, and salicylic acid 0.01 mg/mL and 0.5 mg/mL.

Based on the measured parameters, the Principal Component Analysis (PCA) showed that the treatments that changed radish seedlings the most, compared to the control, were 0.5 mg/mL salicylic acid and 1 mg/mL sodium chloride, based on PC 1, and treatments with sodium chloride and sucrose concentrations of 10 mg/mL based on PC 2, they were clearly separated from the group of samples consisting of control seedlings and those treated with other elicitors. Treatment with salicylic acid 0.01 mg/mL was closest to the control group, which suggested that it differed the least from the nontreated seedlings based on the measured parameters, and we would not recommend it for the general “improvement” of the mentioned radish seedlings properties. The parameters that were closest to the control seedlings were total phenols and kaempferol-rutinoside (in non-hydrolyzed samples), so, compared to other

parameters, these elicitors least affected their share, i.e. we can say they were the most stable. The value of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity was located closer to salicylic acid treatments at concentrations of 0.1 mg/mL and 0.5 mg/mL, which suggested a positive correlation between these treatments and inhibition of the enzyme. Interestingly, all three sucrose concentrations were grouped, while different concentrations of sodium chloride and salicylic acid were separated. This suggests that among the three elicitors tested, the effect of sucrose on radish seedlings was least dependent on the concentration applied, while the effect of sodium chloride and salicylic acid was more dependent on their concentrations. We also noticed that the salicylic acid 0.01 mg/mL and 0.1 mg/mL were closer to each other, as well as to the control group, and the concentration 0.5 mg/mL was further away, which suggested that lower concentrations had a more similar and “milder” effect on seedlings, while the highest concentration caused more significant changes. Given that the three concentrations of sodium chloride were the furthest from each other, we concluded that the effect of this elicitor on radish seedlings changed most significantly depending on the applied concentration.

The method of hierarchical clustering showed that the group treated with salicylic acid 0.5 mg/mL was the furthest from the control and other groups, which suggested that this treatment, when considering all parameters measured, most significantly changed radish seedlings. On the other hand, treatment with the lowest concentration of salicylic acid was closest to the control group, which means that it had the least effect on the mentioned seedlings` parameters.

The relationships between the individual parameters in the seedlings were analyzed using Pearson`s correlation coefficients. There was a strong positive correlation between total proteins and sugars. In contrast, total flavonoids were negatively correlated with total sugars, proteins, and proanthocyanidins. In non-hydrolyzed extracts, quercetin-glucoside and rutinoid, salicylic and caffeic acid, quercetin and kaempferol-rutinoid were positively

correlated. In the hydrolyzed samples, quercetin and quercetin-diglucoside, caffeic acid with quercetin and quercetin-diglucoside, and salicylic and benzoic acid were positively correlated. The degree of  $\alpha$ -glucosidase inhibition was positively correlated with caffeic and salicylic acid in non-hydrolyzed samples, and with benzoic, salicylic and sinapic acid in hydrolyzed samples, which suggested that these acids contributed most significantly to the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase in radish seedlings. Among photosynthetic pigments, chlorophyll *a* and *b* correlated positively with each other, as well as with total chlorophylls. Lycopene was positively correlated with individual and total chlorophylls, but negatively with  $\beta$ -carotene, which means that if lycopene share in radish seedlings increases, the share of  $\beta$ -carotene will decrease and *vice versa*.

**Keywords:** elicitors, seedlings, plant bioactive compounds, antioxidants, enzyme inhibition



**Tablica 6.** Pearsonovi koeficijenti korelacije između fitokemijskog sastava, antioksidacijskog kapaciteta i stupnja inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Tamno otisnute vrijednosti značajne su na razini  $p \leq 0,05$ . n = nehidrolizirani uzorci, h = hidrolizirani uzorci, ABTS, FRAP i ORAC = metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta, Benz = benzojeva kiselina, Fer = ferulična kiselina, Glukozidaza =  $\alpha$ -glukozidaza, Glukozin = ukupni intaktni glukozinoli, K = kempferol, K-gluk = kempferol-glukozid, K-rut = kempferol-rutinozid, Kar = ukupni karotenoidi, Kav = kavena kiselina, Klo = ukupni klorofili, Klo a = klorofil a, Klo b = klorofil b, Klorog = klorogenska kiselina, L-askorb = L-askorbinska kiselina, PANC = ukupni proantocijanidini, Proteini = ukupni proteini, Q = kvercetin, Q-digluk = kvercetin-3,4-diglukozid, Q-gluk = kvercetin-glukozid, Q-rut = kvercetin-rutinozid, Salic = salicilna kiselina, Sin = sinapinska kiselina, Šećeri = ukupni topivi šećeri, TF = eng. *total flavonoids*, ukupni flavonoidi, TP = eng. *total phenolics*, ukupni fenoli, TT = eng. *total tannins*, ukupni tanini.

	TP	TF	TT	PANC	Glukozin	Proteini	Šećeri	K-gluk-n	K-rut-n	Q-n	Q-gluk-n	Q-digluk-n	Q-rut-n	Benz-n	Fer-n	Kav-n	Klorog-n	Salic-n	Sin-n	L-askorb-n	K-h	Q-h	
TP	1,000000																						
TF	-0,508268	1,000000																					
TT	0,477526	-0,740493	1,000000																				
PANC	0,229418	<b>-0,831371</b>	0,527579	1,000000																			
Glukozin	0,397879	0,147368	0,399831	-0,537004	1,000000																		
Proteini	0,543023	<b>-0,848825</b>	0,684495	0,479934	0,205143	1,000000																	
Šećeri	0,700468	<b>-0,855058</b>	0,771054	0,515967	0,289036	<b>0,966830</b>	1,000000																
K-gluk-n	-0,652441	<b>0,844062</b>	-0,509191	-0,501877	0,014691	-0,774196	-0,758833	1,000000															
K-rut-n	-0,636206	0,335081	-0,352591	-0,401496	-0,134835	-0,363513	-0,536595	0,097135	1,000000														
Q-n	-0,571112	-0,092805	-0,243919	0,072394	-0,515462	-0,034529	-0,248754	-0,211809	<b>0,837937</b>	1,000000													
Q-gluk-n	-0,367844	0,742623	-0,233040	-0,798022	0,508869	-0,627342	-0,621208	0,543252	0,572848	0,037372	1,000000												
Q-digluk-n	0,548509	0,043715	0,495082	-0,191660	0,737661	-0,050363	0,154284	-0,022605	-0,272951	-0,629230	0,445864	1,000000											
Q-rut-n	-0,361806	0,663421	-0,131366	-0,745477	0,534903	-0,557079	-0,555407	0,486397	0,592911	0,071426	<b>0,992707</b>	0,468522	1,000000										
Benz-n	0,367482	0,240368	-0,392832	0,043060	-0,241385	-0,410057	-0,243444	0,175552	-0,530436	-0,544737	-0,194217	0,173771	-0,286975	1,000000									
Fer-n	-0,579056	<b>0,818318</b>	-0,487704	-0,519280	-0,020539	<b>-0,951540</b>	<b>-0,918916</b>	0,769934	0,467815	0,063082	0,793515	0,206635	0,752962	0,182685	1,000000								
Kav-n	0,270901	-0,424893	-0,270465	0,395964	-0,591712	0,368681	0,289912	-0,563921	-0,155188	0,277499	-0,767551	-0,620707	-0,801817	0,280007	-0,607425	1,000000							
Klorog-n	<b>0,814228</b>	-0,721484	<b>0,848487</b>	0,457633	0,458739	0,779731	<b>0,910899</b>	-0,588416	-0,702712	-0,558014	-0,449637	0,502406	-0,392211	-0,028067	-0,706042	0,021769	1,000000						
Salic-n	0,193817	-0,470076	-0,221595	0,453794	-0,616320	0,434872	0,336840	-0,533589	-0,176082	0,299522	<b>-0,825295</b>	-0,703837	<b>-0,850883</b>	0,181914	-0,662107	<b>0,984565</b>	0,039690	1,000000					
Sin-n	-0,418267	0,416317	-0,398625	-0,061177	-0,241286	-0,308171	-0,306028	0,729911	-0,385324	-0,345557	-0,147192	-0,372067	-0,209246	0,296350	0,177643	-0,054371	-0,264430	0,035849	1,000000				
L-askorb-n	-0,327579	-0,161827	-0,280797	0,051578	-0,353186	0,393366	0,175624	-0,155007	0,182639	0,502126	-0,439255	<b>-0,875335</b>	-0,442311	-0,404238	-0,492142	0,581576	-0,214651	0,680624	0,257683	1,000000			
K-h	-0,473111	0,662767	-0,265628	-0,731143	0,358004	-0,596011	-0,642341	0,431072	0,768909	0,300403	<b>0,963386</b>	0,283802	<b>0,967444</b>	-0,326260	0,765517	-0,655731	-0,556400	-0,709861	-0,270642	-0,309389	1,000000		
Q-h	0,722218	-0,140075	0,486658	-0,079404	0,620494	0,078476	0,269359	-0,324055	-0,230637	-0,489888	0,285637	<b>0,933561</b>	0,308840	0,227971	0,035602	-0,339195	0,549795	-0,454356	-0,612007	<b>-0,811838</b>	0,178013	1,000000	
Q-digluk-h	0,328560	0,297094	0,200539	-0,367293	0,589793	-0,373357	-0,198046	0,119382	0,031200	-0,410123	0,665889	<b>0,918615</b>	0,668751	0,233119	0,510142	-0,633701	0,145121	-0,752183	-0,423625	<b>-0,918684</b>	0,551453	<b>0,873153</b>	
Benz-h	0,049833	-0,336402	-0,351027	0,249504	-0,577308	0,349637	0,197964	-0,515657	0,115827	0,515220	-0,625510	-0,762796	-0,649819	0,023772	-0,548485	<b>0,947177</b>	-0,153861	<b>0,950112</b>	-0,092303	0,757562	-0,462051	-0,496230	
Fer-h	0,708305	<b>-0,886812</b>	0,558193	0,792413	-0,171066	0,767736	<b>0,837314</b>	-0,751884	-0,667537	-0,234749	<b>-0,884694</b>	-0,012810	<b>-0,852153</b>	0,179259	<b>-0,851667</b>	0,586502	0,772521	0,605563	-0,178956	0,108205	<b>-0,888814</b>	0,174435	
Kav-h	0,739847	-0,028312	0,248998	-0,091745	0,445632	-0,081846	0,125464	-0,259512	-0,296630	-0,533465	0,212695	<b>0,845960</b>	0,201070	0,511690	0,103515	-0,166747	0,419723	-0,309393	-0,500491	<b>-0,818234</b>	0,095010	<b>0,947106</b>	
Klorog-h	0,059073	-0,095586	0,568992	0,223427	0,360932	0,127653	0,259130	0,348493	-0,587483	-0,649336	-0,017838	0,421080	0,018144	-0,049756	-0,004373	-0,603492	0,493624	-0,512496	0,446356	-0,344218	-0,199398	0,145102	
Salic-h	0,192209	-0,455774	-0,235946	0,460585	-0,631637	0,412027	0,320454	-0,509171	-0,200523	0,275344	<b>-0,832659</b>	-0,702352	<b>-0,861615</b>	0,217815	-0,646971	<b>0,984133</b>	0,033766	<b>0,999027</b>	0,066676	0,665748	-0,723936	-0,458414	
Sin-h	0,299923	-0,630665	0,036506	0,576765	-0,582818	0,358645	0,302866	-0,787513	0,104795	0,500657	-0,604266	-0,361223	-0,588821	0,093326	-0,478155	0,802524	0,087616	0,755967	-0,528864	0,249254	-0,420856	-0,021487	
L-askorb-h	0,643441	0,073113	-0,270432	-0,314029	0,279610	0,206377	0,260463	-0,245271	-0,434150	-0,455856	-0,214628	0,093043	-0,285481	0,506791	-0,383146	0,482069	0,251358	0,402851	0,008946	0,122894	-0,321293	0,231177	
$\alpha$ -glukozidaza	0,349100	-0,377671	-0,273779	0,260648	-0,477177	0,299827	0,228726	-0,666510	0,030256	0,360772	-0,571038	-0,453184	-0,600730	0,259435	-0,502739	<b>0,940899</b>	-0,015271	<b>0,877786</b>	-0,341639	0,423483	-0,435276	-0,115914	
Klo a	0,304764	0,560739	-0,186911	<b>-0,843667</b>	0,789496	-0,231719	-0,155900	0,202856	0,030172	-0,442012	0,654731	0,595757	0,612771	0,160322	0,280762	-0,377290	0,018642	-0,475626	-0,162626	-0,359352	0,513679	0,544540	
Klo b	-0,106929	<b>0,884911</b>	-0,616389	<b>-0,905931</b>	0,393485	-0,697059	-0,655087	0,542224	0,267413	-0,219603	0,768275	0,327236	0,690865	0,335857	0,674338	-0,349478	-0,483733	-0,456165	0,068171	-0,336474	0,670416	0,247942	
Klo	0,066221	0,781600	-0,456584	<b>-0,916447</b>	0,580513	-0,525115	-0,466813	0,418223	0,176123	-0,324585	0,750996	0,456546	0,685682	0,274004	0,532407	-0,375889	-0,287016	-0,483375	-0,028558	-0,360221	0,630471	0,386091	
Klo a/b	0,378658	<b>-0,964404</b>	0,761333	<b>0,901978</b>	-0,205609	0,792453	0,806785	-0,672539	-0,418749	0,025452	-0,768265	-0,085454	-0,688188	-0,240027	-0,757153	0,322655	0,702005	0,400687	-0,205643	0,160452	-0,712776	0,021280	
Kar	-0,176992	0,626702	-0,196805	<b>-0,900121</b>	0,747387	-0,169146	-0,211846	0,433431	0,260219	-0,173193	0,714198	0,248984	0,698106	-0,322729	0,287729	-0,533178	-0,173489	-0,533273	0,099233	0,042238	0,621495	0,070351	
$\beta$ -karoten	-0,106288	-0,759893	0,506678	0,778285	-0,393704	0,659627	0,563879	-0,397818	-0,144842	0,322687	-0,691574	-0,485154	-0,616050	-0,489382	-0,626120	0,300715	0,334885	0,437507	0,066436	0,520021	-0,579907	-0,457552	
Likopen	-0,173850	<b>0,904761</b>	-0,622030	<b>-0,952109</b>	0,426152	-0,661459	-0,644078	0,575191	0,302974	-0,185744	0,785570	0,268523	0,711698	0,236383	0,651451	-0,372052	-0,504026	-0,461185	0,113221	-0,240918	0,691899	0,166820	
Klo+Kar	0,047232	0,783798	-0,443759	<b>-0,932799</b>	0,605640	-0,505598	-0,454587	0,427574	0,186536	-0,318242	0,762444	0,448072	0,699970	0,229569	0,522306	-0,396262	-0,283102	-0,496876	-0,018460	-0,333643	0,641908	0,367240	
Klo/Kar	0,175909	0,717315	-0,501620	-0,765655	0,400616	-0,601485	-0,505209	0,331624	0,107259	-0,338271	0,637356	0,477360	0,559858	0,512259	0,553895	-0,230833	-0,290106	-0,372044	-0,091750	-0,489856	0,525391	0,473757	
Klo/(Klo+Kar)	0,082751	0,777309	-0,554283	<b>-0,812585</b>	0,383851	-0,646823	-0,568436	0,396252	0,171697	-0,287586	0,682930	0,424907	0,604088	0,467434	0,603555	-0,258500	-0,367987	-0,392205	-0,050512	-0,445348	0,579109	0,403198	
Kar/(Klo+Kar)	-0,082751	-0,777309	0,554283	<b>0,812585</b>	-0,383851	0,646823	0,568436	-0,396252	-0,171697	0,287586	-0,682930	-0,424907	-0,604088	-0,467434	-0,603555	0,258500	0,367987	0,392205	0,050512	0,445348	-0,579109	-0,403198	
ABTS	0,456527	0,408401	-0,175888	-0,657301	0,597301	-0,269923	-0,166197	-0,036013	0,087877	-0,322067	0,565964	0,649368	0,525114	0,329333	0,287176	-0,199058	0,021961	-0,349679	-0,442056	-0,525945	0,475689	0,723422	
FRAP	0,757601	-0,457935	<b>0,826861</b>	0,223074	0,638070	0,432943	0,617430	-0,415211	-0,482189	-0,582489	-0,002167	<b>0,858325</b>	0,056078	0,018936	-0,280563	-0,347454	<b>0,856017</b>	-0,385571	-0,462027	-0,645740	-0,126792	<b>0,867618</b>	
ORAC	0,741839	<b>-0,891635</b>	0,803369	0,607617	0,229466	<b>0,926031</b>	<b>0,987337</b>	-0,770291	-0,589357	-0,287111	-0,655153	0,208355	-0,589746	-0,149089	<b>-0,886254</b>	0,289789	<b>0,937179</b>						

Q-digluk-h	Benz-h	Fer-h	Kav-h	Klorog-h	Salic-h	Sin-h	L-askorb-h	$\alpha$ -glukozidaza	Klo a	Klo b	Klo	Klo a/b	Kar	$\beta$ -karoten	Likopen	Klo+Kar	Klo/Kar	Klo/(Klo+Kar)	Kar/(Klo+Kar)	ABTS	FRAP	ORAC
1,000000																						
-0,726493	1,000000																					
-0,293293	0,390679	1,000000																				
<b>0,841771</b>	-0,370828	0,181676	1,000000																			
0,160069	-0,717889	0,124981	0,010852	1,000000																		
-0,749862	<b>0,940061</b>	0,606571	-0,303674	-0,496496	1,000000																	
-0,315320	0,759317	0,590956	0,066528	-0,646016	0,745371	1,000000																
0,015981	0,369446	0,278324	0,385018	-0,301336	0,406412	0,111512	1,000000															
-0,395398	<b>0,906759</b>	0,488906	0,047135	-0,785615	<b>0,870150</b>	<b>0,879636</b>	0,510089	1,000000														
0,645443	-0,368214	-0,429670	0,548636	-0,073188	-0,480949	-0,486622	0,562690	-0,197601	1,000000													
0,557495	-0,309890	-0,732901	0,360434	-0,246444	-0,449215	-0,479795	0,369689	-0,187694	<b>0,839963</b>	1,000000												
0,618423	-0,347827	-0,632352	0,456472	-0,181886	-0,481432	-0,502531	0,468179	-0,199710	<b>0,943635</b>	<b>0,972227</b>	1,000000											
-0,365585	0,224193	<b>0,858081</b>	-0,097762	0,297588	0,393181	0,487640	-0,213131	0,203422	-0,678836	<b>-0,956545</b>	<b>-0,876228</b>	1,000000										
0,275033	-0,367701	-0,659371	-0,035193	0,078476	-0,547005	-0,731590	0,224222	-0,463442	0,787528	0,672465	0,749831	-0,654700	1,000000									
-0,698907	0,333960	0,569271	-0,592460	0,245186	0,427758	0,349992	-0,430764	0,103815	<b>-0,842357</b>	<b>-0,961007</b>	<b>-0,949475</b>	<b>0,856656</b>	-0,512219	1,000000								
0,486530	-0,299016	-0,776465	0,255918	-0,226940	-0,456935	-0,539643	0,352218	-0,228595	<b>0,842556</b>	<b>0,990467</b>	<b>0,967531</b>	<b>-0,967141</b>	0,755534	<b>-0,916453</b>	1,000000							
0,601758	-0,356206	-0,646825	0,424321	-0,163703	-0,496201	-0,531332	0,456897	-0,225548	<b>0,948863</b>	<b>0,966036</b>	<b>0,998479</b>	<b>-0,874702</b>	0,785171	<b>-0,931386</b>	<b>0,968563</b>	1,000000						
0,676711	-0,273356	-0,507091	0,616430	-0,281462	-0,363146	-0,299648	0,508030	-0,032200	<b>0,856850</b>	<b>0,947611</b>	<b>0,947556</b>	<b>-0,829670</b>	0,499123	<b>-0,995667</b>	<b>0,901338</b>	<b>0,928498</b>	1,000000					
0,643509	-0,274904	-0,584791	0,541965	-0,292312	-0,383811	-0,341451	0,465464	-0,066203	<b>0,851027</b>	<b>0,973578</b>	<b>0,960883</b>	<b>-0,880377</b>	0,544882	<b>-0,996324</b>	<b>0,936714</b>	<b>0,944785</b>	<b>0,995095</b>	1,000000				
-0,643509	0,274904	0,584791	-0,541965	0,292312	0,383811	0,341451	-0,465464	0,066203	<b>-0,851027</b>	<b>-0,973578</b>	<b>-0,960883</b>	<b>0,880377</b>	-0,544882	<b>0,996324</b>	<b>-0,936714</b>	<b>-0,944785</b>	<b>-0,995095</b>	<b>-1,000000</b>	1,000000			
0,767266	-0,244612	-0,280254	0,782416	-0,304106	-0,354524	-0,133921	0,558737	0,065111	<b>0,898714</b>	0,783900	<b>0,865755</b>	-0,587541	0,476291	<b>-0,882947</b>	0,733879	<b>0,850030</b>	<b>0,906553</b>	<b>0,876759</b>	<b>-0,876759</b>	1,000000		
0,622037	-0,518587	0,450227	0,724865	0,491102	-0,390973	-0,077421	0,095458	-0,251701	0,275807	-0,158969	0,021989	0,415946	-0,030530	-0,027595	-0,209422	0,018037	0,044870	-0,030562	0,030562	0,348722	1,000000	
-0,138650	0,159217	<b>0,890617</b>	0,207392	0,289110	0,314465	0,350103	0,223027	0,232534	-0,209575	-0,686538	-0,509147	<b>0,850814</b>	-0,329894	0,560201	-0,695056	-0,504049	-0,504055	-0,576014	0,576014	-0,170096	0,671940	1,000000

nastavak na prethodnu stranicu

