



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



mr Elvisa Hodžić

**KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE
MELATONINA I MOGUĆIH FUNKCIJA U PRISUSTVU
TEŠKIH METALA U BILJNIM ORGANIMA *MELISSA
OFFICINALIS L. I VALERIANA OFFICINALIS L.***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2019.



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF NATURAL SCIENCES AND MATHEMATICS



Elvisa Hodžić M. Sc.

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION
OF MELATONIN AND ITS POSSIBLE FUNCTIONS IN
THE PRESENCE OF HEAVY METALS IN *MELISSA
OFFICINALIS* L. AND *VALERIANA OFFICINALIS* L.
PLANT ORGANS**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2019.

Mentori: dr. Semira Galijašević, vanredni profesor, Sarajevo School of Science and Technology, Bosna i Hercegovina i dr. Milica Balaban, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banja Luci, Bosna i Hercegovina

Naslov doktorske disertacije: Kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L.

Rezime: Teški metali, zbog nemogućnosti svoje razgradnje, predstavljaju ozbiljan ekološki i nutritivni problem. Akumulacijom esencijalnih i neesencijalnih teških metala u živim organizmima reducira se normalan rast i razvoj, nastaju akutna trovanja, bolesti, pa i smrt organizama. Za melatonin, hormon, je nedavno pokazano da je vrlo značajna multifunkcionalna molekula u zaštiti biljaka od oksidativnog stresa jer ima sposobnost direktnog neutralisanja reaktivnih kisikovih vrsta. U radu je primjenom HPLC-FLD tehnike identificiran i kvantificiran melatonin u korijenu i listu dvije ljekovite biljne vrste, matičnjaku i valerijani, uzgajanim u uslovima fotoperioda. Nadalje, određen je odgovor odabranih biljnih vrsta pretretiranih egzogenim melatoninom koncentracije 0,1 mM na tretman sa povećanim koncentracijama Zn i Cd, pri čemu su praćene promjene u mineralnom, fiziološkom i antioksidativnom statusu biljaka tokom abiotičkog stresa. Određen je sadržaj Mg i Ca, sadržaja neenzimskih antioksidanata (fenoli, flavonoidi), aktivnost enzimskih antioksidanata (DPPH, FRAP, CUPRAC), te sposobnost heliranja metala.

Dobivene koncentracije melatonina u ispitivanim biljnim vrstama su u najvišim granicama objavljenim za suhe biljke do sada, sa jasnim razlikama među vrstama i ispitivanim biljnim organima, uz veće koncentracije prisutne u valerijani u odnosu na matičnjak. Iako se radi o nižim koncentracijama, egzogenom primjenom melatonina povećan je unos Zn i Cd u korijen i njihova translokacija u listove. Određen je pozitivan efekat pretretmana melatoninom na morfološke karakteristike povećavajući rast i razvoj biljaka, ali i na pigmente hloroplasta biljaka tretiranih teškim metalima. Prikazane su i promjene u mineralnom sastavu biljnih vrsta (unos Ca i Mg), nastale izlaganjem teškim metalima.

Pokazane su značajne razlike u biohemijskom i fiziološkom odgovoru biljaka, ovisno o tretmanu metalima i pretretmanu melatoninom. Rezultati ispitivanih parametara u etanolnim ekstraktima korijena i lista matičnjaka i valerijane ukazuju da je oksidativni stres nastao

djelovanjem povećane koncentracije kadmija i cinka. Promjene u neenzimskoj (fenoli i flavonoidi) i enzimskoj (peroksidaze i superoksid dismutaze) antioksidativnoj aktivnosti matičnjaka i valerijane pokazuju da melatonin u uslovima stresa izazvanog teškim metalima poboljšava tolerantnost ispitivanih biljnih vrsta na stres.

Ključne riječi: melatonin, teški metali, matičnjak, valerijana, oksidativni stres

Naučna oblast: Prirodne nauke

Naučno polje: Hemijske nauke

Klasifikaciona oznaka: P 003

Tip odabrane licence Kreativne zajednice: Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada

Mentors: Semira Galijasevic, PhD, Associate Prof., Sarajevo School of Science and Technology, Bosnia and Herzegovina and Milica Balaban, PhD, Associate Prof., Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

Title of the doctoral dissertation: Qualitative and quantitative determination of melatonin and its possible functions in the presence of heavy metals in *Melissa officinalis* L. and *Valeriana officinalis* L. plant organs

Summary: Heavy metals, due to their physical and chemical behavior tend to accumulate in an environment, posing a serious health hazard and ecological problem. Accumulation of essential and non-essential heavy metals in living organisms reduces normal growth and development, resulting in acute poisoning, disease, and even a death of living organisms. Melatonin, pineal hormone, has proven to be a very significant multifunctional molecule in plants protecting it against oxidative stress. It is due to melatonin ability to directly scavenge reactive oxygen species. Using the HPLC-FLD technique melatonin was identified and quantified in the roots and leaves of two medicinal plant species, lemon balm and valerian, grown under photoperiod conditions. Furthermore, the response of selected plant species pretreated with 0.1 mM exogenous melatonin to the treatment with increased concentrations of zinc and cadmium was observed, with changes in the mineral, physiological and antioxidative status of plants during abiotic stress. Magnesium and calcium content, content of non-enzymatic antioxidants (phenols, flavonoids), enzymatic antioxidant activity (DPPH, FRAP, CUPRAC), and metal chelating ability were determined.

The obtained melatonin concentrations in the investigated plant species are at the highest limits published for dry plants so far, with clear differences between species and tested plant organs, measuring higher concentrations in valerians compared to the lemon balm. Though lower concentrations are involved, exogenous melatonin increases Zn and Cd intake in the root and their translocation in the leaves. There was a positive effect of melatonin pretreatment on morphological characteristics, such as increase of the growth and development of plants, and effect on pigments of chloroplasts in heavy metal treated plants. Changes in the mineral composition of plant species (Ca and Mg intake), resulting from heavy metals exposure, are also shown.

Significant differences in the biochemical and physiological response of the plants were demonstrated, depending on the heavy metal treatment and melatonin pretreatment. The results of the investigated parameters in ethanol root and leaf extract of lemon balm and

valerian indicate that oxidative stress is caused by the action of increased cadmium and zinc concentrations. Changes in the non-enzymatic (phenol and flavonoids) and enzymatic (peroxidase and superoxide dismutase) antioxidant activity of the lemon balm and valerian show that melatonin in heavy metal-induced stress improves the tolerance of the tested plant species to the stress.

Key words: melatonin, heavy metals, lemon balm, valerian, oxidative stress

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemical Sciences

Classification Code: P 003

Type the selected license Creative Communities: CC BY-NC-ND

Zahvalnica

Najprije bih željela da se zahvalim dragim mentoricama, prof. dr. Semiri Galijašević koja mi je pružila priliku i vodila me kroz magistarski i doktorski studij i prof. dr. Milici Balaban, koja je imala povjerenja u mene na svim sugestijama i pomoći tokom izrade rada.

Veliku zahvalnost na lijepoj saradnji i savjetima dugujem prof. dr. Biljani Kukavici.

Zahvalnost i ljubav dugujem svojim roditeljima, Seniji i Irfanu, sestrama i bratu, prijateljici i sestri Sebili i mojoj porodici koji su mi pomogli da utabanam put do mjesta na kome se u ovom trenutku nalazim.

Dragom suprugu Aganu, mojoj inspiraciji i izvoru snage, koji je bio uz mene na svakom koraku dok sam se uspinjala stepenicama uspjeha, mojoj divnoj djeci, Asji i Anuru.

Zahvaljujem Bogu što mi ih je darovao...

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	3
3. PREGLED LITERATURE	4
3.1. Hemizam i mehanizam djelovanja melatonina	5
3.2. Melatonin u biljkama	7
3.2.1. Od ideje do otkrića fitohormona	7
3.2.2. Melatonin u biljnim tkivima	10
3.2.3. Ritmovi melatonina u biljkama	11
3.3. Teški metali u zemlji	13
3.3.1. Toksičnost jona Zn	14
3.3.2. Toksičnost jona Cd	17
3.4. Reaktivne vrste kisika i oksidativni stres	19
3.5. Uticaj teških metala na metabolizam biljaka	20
3.5.1. Teški metali uzročnici oksidativnog stresa u biljkama	20
3.6. Antioksidansi u biljkama	21
3.7. Uloga melatonina	22
3.7.1. Uticaj stresa na sintezu biljnog melatonina	25
3.7.1.1. Melatonin štiti biljke od biotičkog i abiotičkog stresa	25
3.7.2. Melatonin i starenje biljaka	29
3.7.3. Melatonin poboljšava rast biljke	30
3.8. Biljke obuhvaćene istraživanjem	32
3.8.1. Matičnjak (<i>Melissa officinalis</i> L.)	32
3.8.2. Valerijana, odoljen (<i>Valeriana officinalis</i> L.)	34
4. MATERIJAL I METODE RADA	38
4.1. Ogled u uslovima fotoperioda	38
4.2. Priprema zemljišta	39
4.3. Gajenje biljaka	39
4.3.1. Uzorkovanje	40
4.3.2. Praćenje morfoloških karakteristika biljaka	41
4.4. Hemikalije i reagensi	42
4.5. Metode mjerenja, kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina	43
4.5.1. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)	43
4.5.2. Ekstrakcija melatonina iz biljnog materijala (list i korijen, pojedinačno)	46
4.6. Određivanje sadržaja teških metala atomskom apsorpcionom spektrofotometrijskom analizom (AAS)	48
4.6.1. Plamena atomska apsorpciona spektrometrija	49
4.6.2. Grafitna ili elektrotermička AAS	50
4.6.3. Priprema biljnog materijala mikrotalasnom digestijom	52
4.7. <i>In vitro</i> testovi mjerenja antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata	53
4.7.1. Priprema ekstrakata	55
4.7.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala	56
4.7.3. Određivanje sposobnosti redukcije ekstrakata FRAP testom (Ferric Reducing/Antioxidant power)	57
4.7.4. Određivanje sposobnosti redukcije Cu(II) jona (CUPRAC test)	59

4.7.5.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola spektrofotometrijski reakcijom po Folin-Ciocalteau	61
4.7.6.	Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	62
4.8.	Određivanje posobnost biljnih ekstrakata da heliraju metale	63
4.9.	Određivanje sadržaja solubilnih proteina	64
4.10.	Određivanje aktivnosti peroksidaza spektrofotometrijskom metodom	66
4.11.	Nativna poliakrilamid gel elektroforeza (PAGE)	66
4.12.	Određivanje sadržaja pigmenata hloroplasta	67
4.13.	Statistička obrada podataka	68
5.	REZULTATI I DISKUSIJA	69
5.1.	Fizičko-hemijska svojstva zemljišta	69
5.1.1.	Meteorološki uslovi tokom izvođenja ogleda	69
5.2.	Melatonin u biljnim vrstama <i>Melissa officinalis</i> L. i <i>Valeriana officinalis</i> L.	70
5.2.1.	Sadržaj teških metala u analiziranim biljnim vrstama	78
5.2.1.1.	Uticaj tretmana zemljišta na sadržaj i biodostupnost cinka	78
5.2.1.2.	Uticaj tretmana zemljišta na sadržaj i biodostupnost kadmija	81
5.2.2.	Uticaj melatonina i teških metala na mofrometrijske i fiziološke parametre	84
5.2.2.1.	Analiza glavnih komponenti morfometrijskih i fizioloških parametara	93
5.2.3.	Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj makroelemenata u ispitivanim biljnim organima	95
5.2.4.	Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj fenola i flavonoida u ispitivanim biljnim organima	99
5.2.5.	Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj solubilnih proteina i aktivnost antioksidativnih enzima u ispitivanim biljnim organima	103
5.2.6.	Uticaj melatonina i teških metala na antioksidativnu aktivnost ekstrakata ispitivanih biljnih organa	110
5.2.6.1.	Sposobnost ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane na redukcioni kapacitet	111
5.2.6.2.	Sposobnost ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane da neutrališu DPPH radikal	112
5.2.6.3.	Sposobnost ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane da redukuju Cu(II) jone, CUPRAC test	114
5.2.7.	Uticaj melatonina i teških metala na sposobnost heliranja teških metala	117
5.2.8.	Analiza glavnih komponenti praćenih hemijskih parametara	120
6.	ZAKLJUČAK	124
7.	LITERATURA	129
	PRILOG 1	147

1. UVOD

Melatonin (*N*-acetil-5-metoksitriptamin) je indolamin, široko rasprostranjen u životinjskom svijetu (Arnao i Hernandez-Ruiz, 2015), gdje kod kičmenjaka ima veoma važnu ulogu kao hormon, posebno neurohormon. Od otkrića i detekcije u biljkama 1995. godine (Hattori i sar., 1995; Dubbs i sar., 1995) istraživanja melatonina privukla su veliku pažnju istraživača, posebno u otkrivanju mogućih fizioloških funkcija u biljkama. Posljednjih nekoliko godina melatonin je identificiran i kvantificiran u više od 140 biljnih vrsta (Zohar, 2011; Hardeland i sar., 2007). Budući da su biljke sesilne, kroz svoj životni ciklus one moraju podnositi mnoge stresove. Kada su izložene stresnom okruženju, unutar biljnih ćelija se mora desiti brza i ogromna promjena kako bi preživjele. Melatonin je amfifilna molekula koja vrlo lako difundira kroz ćelijske membrane u citoplazmu i ulazi u subćelijske odjeljke. Teški metali poput Zn i Cu su esencijalni za normalan rast biljaka, ali višak metala je toksičan. Metalni jon veže se za sulfhidrilnu grupu u enzimima i drugim proteinima inhibirajući njihovu aktivnost ili remeteći njihovu strukturu. Nadalje, teški metali uzrokuju oksidativna oštećenja biomolekula tako što pokreću lančane reakcije posredovane slobodnim radikalima rezultirajući lipidnom peroksidacijom, oksidacijom proteina i nukleinskih kiselina (Zhang i sar., 2014).

Znatan broj istraživanja ukazao je na značaj melatonina u reguliranju skoro svih faza rasta i razvoja biljaka (od klijanja sjemena do starenja listova), kao i obranu od različitih biotičkih i abiotičkih stresova okoliša, poput suše, saliniteta, ekstremno niskih ili visokih temperatura, raznih patogena i hemijskih agenasa (Byeon and Back, 2014; Zhang i sar., 2015; Shi i sar., 2015, Arnao i Hernandez-Ruiz, 2015). Djelotvorna uloga melatonina u reduciranju stresa kod biljaka se najčešće može pripisati povećanoj fotosintezi, poboljšanju ćelijske redoks homeostaze i ublažavanju oksidativnog stresa, te regulaciji ekspresije gena odgovornih za stres (Li i sar., 2014). Kao faktori abiotičkog stresa teški metali narušavaju fundamentalne metaboličke procese dovodeći do anatomskih, morfoloških, fizioloških i biohemijskih poremećaja. Metali svoje toksično djelovanje ispoljavaju i na način da dovode do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koji narušavaju redoks homeostazu ćelije.

U zaštiti od negativnog uticaja biljke su razvile mehanizme za smanjenje unosa metala u citosol ćelije stvaranjem kompleksa sa fitohelatinima, organskim kiselinama i metalotioneinima kako bi spriječile inaktivaciju katalitički aktivnih proteina metalima.

Biljni hormoni igraju važnu ulogu sekundarnog signala o abiotičkom i oksidativnom stresu složenim signalnim putevima, najčešće regulacijom ekspresije odbrambenih gena za detoksifikaciju ili gena koji kodiraju transportne proteine za jone metala.

Identifikacija i kvantifikacija melatonina, kao ni analize biohemijskih i morfoloških karakteristika matičnjaka i valerijane pod uticajem teških metala i egzogenog melatonina dosada nije sprovedena.

Ovaj rad razmatra ulogu melatonina kao molekule signalizacije u prenosu signala iz okoliša i posredovanju reakcije biljaka izloženih maksimalno dozvoljenim koncentracijama kadmija i cinka. U okviru rada izvršena je procjena djelovanja egzogeno dodanog melatonina na njegov endogeni nivo u biljnim vrstama *Melissa officinalis* i *Valeriana officinalis*, dvjema ljekovitim biljkama poznatim po blagotvornom djelovanju kod nesаницe i depresije. Upoređeni su i biološki odgovori na prisustvo metala akumulacijom melatonina ili promjenom aktivnosti antioksidativnih enzima u korijenovima i listovima matičnjaka i valerijane. Melatonin može, pored antioksidativne uloge, stvarati komplekse sa metalima i na taj način ispoljiti svoju zaštitnu ulogu.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Melatonin je hormon, identifikovan kao izvanredna molekula signalizacije ne samo doba dana ili godine, već i promoviranja imunomodulatornih svojstava i svojstava zaštite ćelije kod životinja i ljudi. Brojna istraživanja o zaštitnom djelovanju melatonina u živom svijetu ukazuju na njegovo moguće slično djelovanje i u biljnom svijetu. Ovaj neurohormon je identificiran u mnogim biljkama, uključujući i jestive sorte.

Cilj doktorske teze je, prije svega, identifikacija i kvantifikacija melatonina u dvije odabrane ljekovite biljne vrste, kao i njegova distribucija unutar same biljke.

Nadalje, budući da je ranije prikazano da tretiranje sa hemijskim agensima kao što su vodonik-peroksid, natrij-hlorid ili cink-sulfat, stimulira endogene nivoe melatonina u korijenu pojedinih biljaka ovisno o vremenu izlaganja i koncentraciji, što igra značajnu ulogu u antioksidativnoj odbrani protiv hemijski induciranog stresa, istražiće se moguće odbrambeno svojstvo melatonina u borbi protiv povećanih koncentracija teških metala, kadmija i cinka, kao i moguće inhibitorno djelovanje teških metala na aktivnost melatonina u regulaciji rasta biljke.

Konačno, cilj istraživanja će biti usmjeren na određivanje antioksidativne uloge melatonina prateći promjene u enzimatskoj i neenzimatskoj antioksidativnoj aktivnosti.

3. PREGLED LITERATURE

Ishrana bogata biljnim namirnicama promovise zdravlje pružanjem neophodnih hranjivih tvari i fitohemikalija ljudskom organizmu (Potter i Hotchkiss, 1995). Biljke su se kroz historiju koristile i kao lijek i kao otrov. Fitohemikalije su nenutritivna bioaktivna biljna jedinjenja koja su od posebnog interesa za istraživače hrane upravo zbog blagotvornog djelovanja na ljudsko zdravlje. Većina biljnih namirnica prolazi kroz preradu prije konzumiranja tokom koje fitohemikalije mogu biti uništene. Stoga, u interesu je za ljudsko zdravlje identificirati korisne fitohemikalije u hrani, kao i utvrditi stabilnost ovih spojeva tokom proizvodnog procesa. Fitohemikalije predstavljaju spojeve od kojih značajan dio ne učestvuje direktno u metabolizmu i reprodukciji ćelije, njenom rastu i razvoju, a označene su kao sekundarni metaboliti. Različito su distribuirane u ograničenim taksonomskim grupama unutar biljnog carstva. Istraživanje novih lijekova, antibiotika, insekticida i herbicida potiče poznavanje bioloških svojstava ovih prirodnih produkata. Nadalje, interes za vrlo raznolike biološke efekte fitohemikalija pokreće ponovnu procjenu mogućih uloga koje imaju te tvari u biljkama, posebno u smislu ekoloških interakcija.

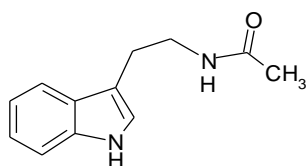
Struktura, vrsta, zastupljenost u pojedinim biljnim dijelovima i biološka aktivnost spojeva istražene su mnogim analitičkim metodama (Xu i sar., 2017). Među brojnim, hromatografija u tankom sloju (TLC), nuklearna magnetna rezonanca (NMR), atomska apsorpciona spektroskopija (AAS), gasna hromatografija (GC), tekuća hromatografija visokih performansi (HPLC), kapilarna elektroforeza, te gasna i tekućinska hromatografija povezana sa masenim spektrofotometrom (GC-MS, LC-MS) su najčešće primijenjivane metode određivanja metaboličkih spojeva.

Melatonin (*N*-acetyl-5-metoksitriptamin) je indolamin izoliran 1958. godine iz goveđe epifize (Lerner i sar., 1958), a kasnije otkriven u organizamima kao što su bakterije, jednoćelijske- i višećelijske alge, beskičmenjaci, kičmenjaci, te više biljke (Gomez i sar., 2012; Tan i sar., 2012).

Kod kičmenjaka pinealna žlijezda uglavnom proizvodi melatonin (slika 1), koji se ritmički luči u krvotok. Djeluje u regulisanju fizioloških procesa, uključujući cirkadijani ritam i fotoperiodizam (Reiter, 1991). Melatonin je identifikovan kao izvanredna molekula signalizacije ne samo doba dana ili godine, već i promoviranja imunomodulatornih svojstava i

svojstava zaštite ćelije kod životinja i ljudi. Svojstvo melatonina u izravnom vezanju slobodnih radikala izdvajaju melatonin od klasičnog hormona (Tan i sar., 2003).

U ljudskom organizmu melatonin se sintetizira noću, dok se pod uticajem svjetlosti njegova koncentracija u krvi smanjuje (Cardinali i Pevet, 1998). Dakle, dnevni nivoi melatonina mogu poslužiti u informiranju ćelija o dobu dana i godišnjem dobu. Egzogene primjene melatonina mogu "oponašati" tamu i tako uticati na cirkadijurne ritmove mnogih životinja (Reiter, 1991; Posmyk i Janas, 2008).



Slika 1. Struktura melatonina

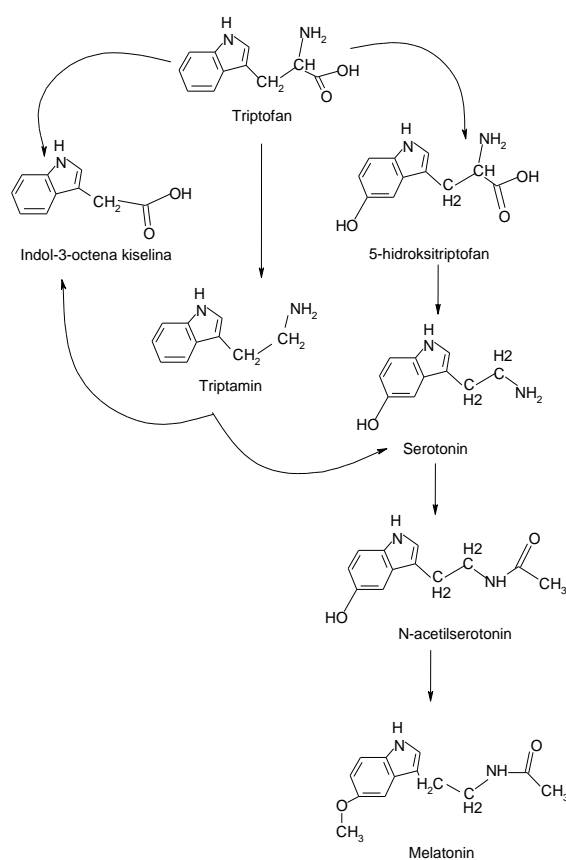
U ljudskom organizmu nivoi melatonina zavise od dobne starosti, pri čemu se veće koncentracije javljaju kod mladih osoba – sinteza melatonina se postepeno smanjuje sa godinama.

3.1. Hemizam i mehanizam djelovanja melatonina

Melatonin se proizvodi u sisavcima i biljkama kroz triptofan metabolički put sa serotoninom kao neposrednim prethodnikom (Murch i sar., 2000). Sadrži indolni prsten s alkilamidnim bočnim lancem i benzenov prsten sa metoksilnim bočnim lancem.

Melatonin je relativno mala molekula, sa molekulskom masom od 232 g/mol. Iako je pokazano da melatonin prolazi kroz membrane i ulazi u sve dijelove ćelije, teško se iz praškaste forme otapa u vodenom rastvoru (Shida i sar., 1994; Reiter i Kim, 1999). Međutim, Shida i saradnici (1994) su otkrili da je melatonin lako topiv u vodenom mediju ako se prvo otopi u rastvaraču, a zatim ispari do suha. Vrlo je stabilna molekula u rastvoru, skladištenjem na 4°C (Shida i sar., 1994). Iako sadrži i lipofilni i hidrofilni dio, nađeno je da se melatonin prvenstveno nalazi u polarnoj regiji preokrenutih micela i u vodenoj fazi (60%) micela (Ceraulo i sar., 1999; Mekhloufi i sar., 2007). Melatonin apsorbuje svjetlo na 254 nm i na taj način je osjetljiv na UV razgradnju (Bromme i sar., 2008). Prikazano je da izlaganje rastvora melatonina koncentracije 0,1 mg/mL UV svjetlosti pri 400 W smanjuje koncentraciju na 18% od prvobitne u roku od 20 minuta i potpuno ga degradira nakon 2 sata (Maharaj i sar., 2002). *N*¹-acetyl-*N*²-formil-5-methoksikinuramin (AMFK) je krajnji proizvod foto-degradacije

melatonina i održava antioksidativnu aktivnost (Maharaj i sar., 2002). Melatonin je posebno efikasan u inhibiranju oksidacije. Preko AFMK uklanja do 10 reaktivnih vrsta, povećavajući sposobnost melatonina u neutralisanju slobodnih radikala (Tan i sar., 2007a). Indolni prsten je primarni izvor oksidativne interakcije zahvaljujući visokoj rezonantnoj stabilnosti prstena i niskoj granici aktivacijske energije. Amidni bočni lanac je odgovoran za uklanjanje drugih reaktivnih vrsta i formira nove petočlane prstene, dok metoksi-grupa prevenira prooksidativnu aktivnost (Tan i sar., 2002). Istraživanja melatonina i 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) kation radikala (ABTS) dovela su do otkrivanja derivata AMFK, iako degradacijski put i svojstva molekula nisu utvrđena (Rosen i sar., 2006).



Slika 2. Put biosinteze melatonina u sisara i biljaka (Murch i sar., 2000)

Mnoga preklinička i klinička istraživanja naglašavaju hipnotičke efekte melatonina, ali druga nisu našla značajnije efekte ni na jednom nivou. Njegova klinička efikasnost je još uvijek dilema. Također, još uvijek nije poznato da li melatonin direktno djeluje na regulaciju sna ili na cirkadijurne ritmove povezane sa snom (Srinivasan i sar., 2015).

3.2. Melatonin u biljkama

3.2.1. Od ideje do otkrića fitohormona

Nakon identifikacije u epifizi melatonin je prikazivan isključivo kao animalni hormon - neurohormon (Reiter, 1991). U tom periodu gotovo sva istraživanja vezana za melatonin se izvode u tkivima i ćelijama životinja. Međutim, neka rana zapažanja su bila na efektima melatonina u biljkama, naprimjer, u endospermu *Scadoxus multiflorus* (syn. *Haemanthus katherinae*) (Jackson, 1969) i u epidermu crvenog luka, *Allium cepa* (Banerjee i Margulis, 1973). Promjene su zabilježene u mitotičkim vretenima, koje bi mogle dovesti do zaustavljanja mitoze. Na osnovu ovoga se mogu objasniti kasnije dobiveni rezultati o inhibiciji rasta algi *Pterygophora californica* (Fuhrberg i sar., 1996).

Od sredine do kraja 1970-ih, melatonin je evidentiran kao nusproizvod procesa uklanjanja kofeina iz zrna kafe, vjeruje se kao rezultat neočekivane hemijske reakcije (Tan i sar., 2012). Ovo je vjerojatno prva naznaka da biljke ili biljni proizvodi sadrže melatonin.

Časopis Science je 1991. godine objavio rad o prisustvu i ulozi melatonina u fotosintezi morske alge *Gonyaulax polyedra*, odgovorne za crvene plime. Količine melatonina pokazuju cirkadijalni ritam koji opstaje i kada se organizmi održavaju u stalnom mraku (Poeggeler, 1991), što je dovelo do otkrića melatonina u višim biljkama (Dubbels i sar., 1995, Manchester i sar., 2000).

Melatonin, uglavnom promatran kao neurohormon, uklanja slobodne radikale i ima antioksidativna svojstva, što je i objavljeno 1993. godine (Tan i sar., 1993). Antioksidativna zaštita u ćelijama i tkivima predstavlja visoko očuvanu funkciju u svim aerobnim organizmima, uključujući i biljke. Podstaknuti tom ulogom, Manchester i saradnici (1995) testirali su primitivnu fotosintetsku bakteriju (*Rhodospirillum rubrum*) na prisustvo melatonina. Pokazali su da je melatonin ne samo prisutan, nego da je ovaj organizam sposoban proizvoditi melatonin, sa visokim koncentracijama za vrijeme mraka i nižim tokom dana. Slična nalaženja su dobivena kod *Erythro bacterlongus* (Tilden i sar., 1997). Pretpostavlja se da bakterije koriste melatonin za zaštitu od oksidativnog stresa pod aerobnim uslovima.

Skoro istovremeno, 1994. godine, dvije istraživačke grupe objavile su rezultate u kojima pokazuju prisustvo melatonina u biljkama (Dubbels i sar., 1995; Hattori i sar., 1995). Istraživane biljke, odnosno biljni proizvodi su duhan, riža, kukuruz, pšenica i banana, između

ostalnih. Nađene su visoke koncentracije melatonina u ljekovitim biljkama hrizantema, *Tanacetum parthenium* i kantarion, *Hypericum perforatum* (Murch i sar., 1997), koje su iznosile nekoliko mikrograma po gramu tkiva (količine više od onih nađenih u krvi). Ubrzo je otkriven i dnevni ritam melatonina u biljci *C. Rubrum* (crvena loboda), sa najvećim količinama tokom noći i nižim tokom dana (Kolar i sar. 1999). Koncentracije melatonina tokom dana u kantarionu su povezane sa intenzitetom svjetlosti kojem su izložene biljke. U međuvremenu, prikazano je u raznim biljkama koje sadrže velike količine melatonina da odgovaraju na intenzivnu svjetlost, posebno UV, povećanjem metoksilnog indola (Afreeni sar., 2006). Ovo ukazuje na fotozaštitnu ulogu, što je već pretpostavljeno zbog brojnih fotoreakcija kojima melatonin podliježe i sposobnosti melatonina da neutrališe singletni kisik i slobodne radikale uzrokovane UV zrakama (Hardeland, 2008b).

Tan i saradnici (2000) su izvijestili da biljke značajno povećavaju sadržaj melatonina pri prelasku iz okruženja sobne temperature na hladno (4°C). Na osnovu činjenice da je melatonin snažan antioksidans, pretpostavljalo se da melatonin može biti prva linija obrane u zaštiti biljaka od surovog okruženja, kao što je hladnoća, vrućina, suša i zagađenje zraka ili zemljišta. Hipoteza je naknadno podržana drugim objavljenim rezultatima (Murch i sar., 2009; Tan i sar., 2010). Posebno su povišene količine melatonina u biljkama iz alpskog i mediteranskog okruženja, izložene intenzivnom UV zračenju i velikim temperaturnim razlikama (Hardeland i sar., 2007; Murch i sar., 2009).

Do danas su objavljene brojne publikacije o prisustvu melatonina u biljkama i biljnim proizvodima sa širokim spektrom koncentracije, od nekoliko pikograma do nekoliko mikrograma po gramu tkiva (Posmyk i Janas, 2008; Paredes i sar., 2009). Na osnovu podataka istraživanja na životinjama u proteklih nekoliko desetljeća, količine melatonina u krvi i tkivima životinja od beskičmenjaka do sisara su prilično ujednačene i kreću se u rasponu od niskih pikograma po mililitru u toku dana do stotina pikograma po mililitru noću (Reiter, 1986). Smatralo se da su nastale razlike u količini melatonina u biljkama i sisarima posljedica korištenih različitih metodologija u ekstrakciji i mjerenju fitomelatonina (Reiter i sar., 2007; Arnao i Hernandez-Ruiz, 2009a).

Kako je prikazano u novijim istraživanjima, koncentracije melatonina razlikuju se ne samo među biljnim vrstama već i među sortama iste vrste, a ovise o stepenu rasta, lokaciji, specifičnom biljnom organu, kao i vremenu i sezoni žetve (Murch i sar., 2009; Stege i sar., 2010). Melatonin je dosad izoliran iz algi i iz više od 20 mono- i dikotiledon familija

cvijetnica. Međutim, njegovo prisustvo još uvijek nije istraženo u drugim grupama biljaka poput mahovine, paprati, golosjemenica itd.

Tabela 1. Sadržaj melatonina u jestivim biljnim plodovima

Familija	Naziv	Latinski naziv	Sadržaj melatonina (ng/g)	Literaturni izvor
Actinidiaceae	Kivi	<i>Actinidia deliciosa</i> Liang-Ferg.	0,0244	Hattori i sar., 1995
Amaranthaceae	Cikla	<i>Beta vulgaris</i> L.	0,002	Dubbels i sar., 1995
Amaryllidaceae	Češnjak	<i>Allium cepa</i> L.	0,03	Hattori i sar., 1995
Apiaceae	Mrkva	<i>Daucus carota</i>	0,06 K	Hattori i sar., 1995
	Celer	<i>Apium graveolens</i> L.	7 S	Manchester i sar., 2000
	Korijander	<i>Coriandrum sativum</i> L.	7 S	Manchester i sar., 2000
	Anis	<i>Pimpinella anisum</i> L.	7 S	Manchester i sar., 2000
Brassicaceae	Kupus	<i>Brassica oleracea</i> L.	0,1 L	Hattori i sar., 1995
	Crvena rotkvica	<i>Raphanus sativus</i> L.	0,6 K	Hattori i sar., 1995
	Crni senf	<i>Brassica nigra</i> L.	129 S	Manchester i sar., 2000
	Bijeli senf	<i>Sinapis alba</i> L.	189 S	Manchester i sar., 2000
Cruciferae	Repa	<i>Brassica campestris</i> L.	0,7 K	Hattori i sar., 1995
Cucurbitaceae	Krastavac	<i>Cucumis sativus</i> L.	11 P	Posmyk i sar., 2009
Papaveraceae	Mak	<i>Papaver somniferum</i> L.	6 S	Manchester i sar., 2000
Poaceae	Zob	<i>Avena sativa</i> L.	2 S	Hattori i sar., 1995
	Kukuruz	<i>Zea mays</i> L.	2 S	Hattori i sar., 1995
	Riža	<i>Oryza sativa japonica</i> L.	1 S	Hattori i sar., 1995
	Ječam	<i>Hordeum vulgare</i> L.	0,4 S	Hattori i sar., 1995
Rosaceae	Mediteranska mušmula	<i>Crataegus azarolus</i> L.	0,435 L	Hattori i sar., 1995
	Glog	<i>Crataegus aronia</i> L.	0,341 L	Hattori i sar., 1995
	Grmolika kupina	<i>Rubus fruticosus</i> Hegetschw.	0,805 L	Hattori i sar., 1995
	Divlja jagoda	<i>Fragaria ananassa</i>	0,01 P	Hattori i sar., 1995
	Badem	<i>Prunus amygdalus</i>	39 S	Manchester i sar., 2000
Solanaceae	Paradajz	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	0,0322 P	Hattori i sar., 1995
	Zelena paprika	<i>Solanum pimpinellifolium</i> L.	0,521 P	Huang i sar., 2011
Vitaceae	Loza	<i>Vitis vinifera</i> L.	3 – 18 P	Vitalini i sar., 2011
Zingiberaceae	Đumbir	<i>Zingiber officinale</i>	0,6 K	Hattori i sar., 1995
	Kurkuma	<i>Curcuma aeruginosa</i> Roxb.	120	Chen i sar., 2003

* L – list; C – cvijet; K – korijen; S – sjeme; P – plod

Nakon identifikacije melatonina u biljkama 1995. godine, isti je određen u korijenu, listu, plodovima, cvijetu i sjemenu raznog povrća, voća, žitarica i ljekovitog bilja (Korkmaz i sar., 2014), u koncentracijama između nekoliko pikograma do nekoliko mikrograma po gramu tkiva (Tabela 1 i 2).

Tabela 2. Sadržaj melatonina u nekim višim biljkama

Familija	Naziv	Latinski naziv	Sadržaj melatonina (ng/g)	Literaturni izvor
Anacardiaceae	Ciparska terpentina	<i>Pistacia palaestina Boiss.</i>	0,498 L	Hattori i sar., 1995
	Pistacija	<i>Pistacia lentiscus L.</i>	0,581 L; 0,539 F	Hattori i sar., 1995
Arecaceae	Datula	<i>Phoenix dactylifera L.</i>	0,469 L	Hattori i sar., 1995
Asparagaceae	Divlje šparuge	<i>Asparagus horridus L.</i>	0,142 L	Hattori i sar., 1995
	Mirta	<i>Ruscus aculeatus L.</i>	0,954 L	Hattori i sar., 1995
Asteraceae	Kamilica	<i>Tanacetum parthenium L.</i>	1,3- 1,7(μg/g)L	Murch i sar., 1997
	Stolisnik	<i>Achillea millefolium L.</i>	34,0 L+S	Marioni i sar., 2008
	Suncokret	<i>Helianthus annuus L.</i>	29 S	Manchester i sar., 2000
Convolvulaceae	Ivy morning glory	<i>Ipomoea nil L.</i>	0,006 S	Zhang i sar., 2013
Fabaceae	Kineski sladić	<i>Glycyrrhiza uralensis Fisch.</i>	0,250L; 34(μg/g) K	Afreen, 2006
Hypericaceae	Kantarion	<i>Hypericum perforatum L.</i>	1,8-23 (μg/g)L 1,7 (μg/g)C	Murch i sar., 1997
Lauraceae	Lovor	<i>Laurus nobilis L.</i>	0,008331L; 0,00371C	Hattori i sar., 1995
Meliaceae	Bijeli cedar	<i>Melia azedarach L.</i>	0,0016 L; 0,585 C	Hattori i sar., 1995
Moraceae	Smokva	<i>Ficus carica L.</i>	0,012915L;	Hattori i sar., 1995
	Dud	<i>Morus spp. L.</i>	0,003959C, 0,990L	Hattori i sar., 1995
Myrtaceae	Ananas guava	<i>Feijoa sellowiana O.Berg</i>	0,001529 L	Hattori i sar., 1995
Oleaceae	Maslina	<i>Olea europaea L.</i>	0,0043 L; 0,532 C	Hattori i sar., 1995
Resedaceae	Arapski pustinjaški grm	<i>Ochradenus baccatus De L.</i>	0,474 L	Hattori i sar., 1995
Rhamnaceae	Mediteranska krkavina	<i>Rhamnus alaternus L.</i>	0,584 L; 0,306 C	Hattori i sar., 1995
Solonaceae	Crno velebilje	<i>Solanum nigrum L</i>	0,323 C	Hattori i sar., 1995
Styracaceae	Divica	<i>Styrax oicinalis L.</i>	0,004069 L	Hattori i sar., 1995
Verbenaceae	Lantana	<i>Lantana camara L.</i>	0,389 L	Zohar i sar., 2011

* L – list; C – cvijet; K – korijen; S – sjeme; P – plod

3.2.2. Melatonin u biljnim tkivima

Tkiva koja proizvode gamete i sami gameti (jajašce), teoretski sintetiziraju vlastiti melatonin kako bi se zaštitili od štetnog djelovanja toksičnih slobodnih radikala kod sisavaca (Reiter i sar., 2014). Također, većina sjemenki je bogata polinezasićenim mastima koje lako oksidiraju, pa bi moćan antioksidans kao što je melatonin bio važan u smanjenju njihovog oštećenja.

Manchester i saradnici (2000) su procijenili koncentracije melatonina u sjemenkama 15 različitih biljaka i sve su imale visok indolni nivo. Njihove vrijednosti su varirale 2-200 µg/g suhe tvari sa najvišim koncentracijama u sjemenu bijelog i crnog senfa. U orahu (*Juglans regia* L.), nivoi melatonina su u istom rangu (3,5 µg/g suhe tvari) (Reiter i sar., 2005). Takođe, treba napomenuti da je najviši nivo melatonina mjereno u svim biljnim organima do sada u pistacijama (*Pistacia vera*), gdje su prijavljene vrijednosti u rasponu od nekoliko mg/mL metanolnog ekstrakta (Oladi i sar., 2014). Očigledno, sjemena i biljke sadrže količine melatonina koje znatno premašuju one mjerene u krvi i tkivu kičmenjaka (Pang, 1985; Venegas i sar., 2012), gdje su koncentracije obično u pg/mL i pg/g proteina.

Podatak o visokoj koncentraciji melatonina u pistacijama je od posebnog interesa s obzirom da je pistacija pustinjska biljka i preživi duga razdoblja bez vode. Štoviše, ova biljka je vrlo tolerantna prema slanom zemljištu i može preživjeti temperature okoliša u rasponu od -10°C do 48°C. Svaki od pomenutih okolnosti (suša, izloženost salinitetu i ekstremnim temperaturama) regulira povišenje proizvodnje melatonina u biljkama (Oladi i sar., 2014). Na temelju toga, pustinjske biljke općenito mogu imati visoke nivoe melatonina, npr. kaktusi i pustinjska kadulja, neven, ljiljan, stablo vrbe itd. Isto tako, koncentracije melatonina se mogu odnositi na regionalnu distribuciju, tako da biljke koje obično rastu, naprimjer, u tundrama imaju povišene koncentracije melatonina, što im također pomaže u njihovom opstanku u oštrim, hladnim uvjetima.

Chen i saradnici su odredili koncentracije melatonina u 108 kineskih ljekovitih biljaka (Chen i sar., 2003). Istraživači su pretpostavili da ako je melatonin prisutan u značajnim količinama u biljkama, onda može biti važan faktor u uočenom blagotvornom djelovanju tih biljaka. Proizvodi iz kojih se pripremaju ekstrakti uključuju dijelove cvijetova, sjemena, listova, korijena i stabljike uz primjenu u tradicionalnoj kineskoj medicini. Melatonin je određen kod većine testiranih biljaka. Čak 64 biljke su imale vrijednosti od preko 10 ng/g suhe tvari, a nekoliko njih su imale količine veće od 1 µg/g. Istraživanja ukazuju na mogućnost pridonosa melatonina u medicinskoj vrijednosti ovih biljaka. Melatonin, kao i niz nusproizvoda koji se formiraju kod detoksificiranja slobodnih radikala od strane melatonina, djeluje u smanjenju oksidativnog stresa (Hardeland i sar., 2011).

3.2.3. Ritmovi melatonina u biljkama

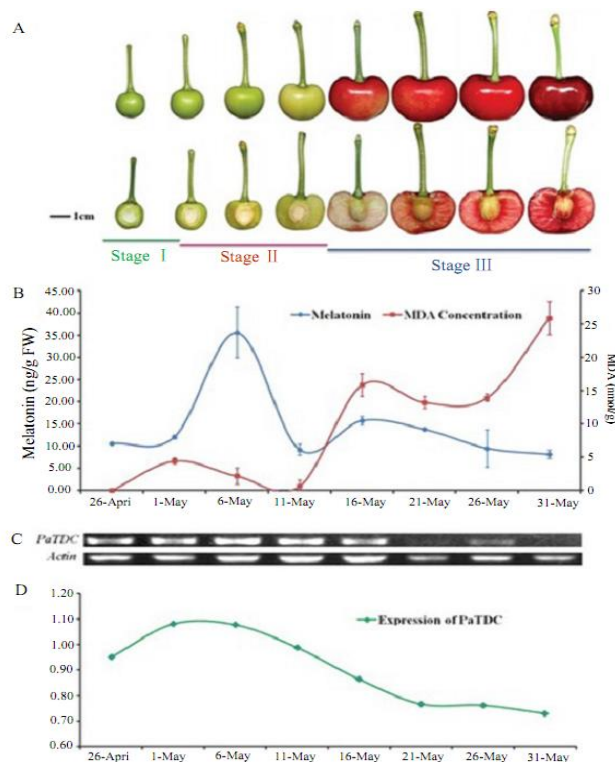
U krvi sisavaca koncentracije melatonina pokazuju ritam sa niskim vrijednostima tokom dana i visokim tokom noći (Paul i sar., 2015). S obzirom na sveprisutni ritam melatonina u

sisavcima, pitanje je da li se slične varijacije odvijaju u biljkama i da li je melatonin uključen u fotoperiodizam biljnih vrsta. Primjenjujući korov (*Chenopodium rubrum*, syn, *Oxybasis rubra*, crvena loboda), koji raste u umjerenim klimama u mnogim dijelovima svijeta, Kolar i saradnici (1999) su utvrdili da u ovoj vrsti noćne koncentracije melatonina premašuju one izmjerene u biljkama ubranim tokom dana. Prema tome, u ovoj biljci, kao i kod sisavaca, ritam melatonina može dati podatke u pogledu dužine noći. Za razliku od ovih rezultata, Tan i saradnici (2007b) su u biljci zumbul (*Eichornia crassipes*(Mart) Solms) otkrili da količine melatonina pokazuju ritam, ali se najveće koncentracije javljaju krajem dana, a ne tokom noći. Isto tako, dnevne količine melatonina veće su pri uzgajanju biljaka pod suncem (10,000-15,000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) u odnosu na one uzgajane pod umjetnim svjetlom (400-450 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$). Dakle, u ovim biljnim vrstama melatonin očito ne služi kao vjesnik tame (Tan i sar., 2007b).

Višnja (*Prunus cerasus*) je prvi plod u kojem su količine melatonina sveobuhvatno istraživane (Burkhardt i sar., 2001). Dvije testirane sorte, sadrže značajno različite koncentracije melatonina (13,4 $\mu\text{g}/\text{g}$ i 2,1 $\mu\text{g}/\text{g}$ svježe mase). Budući da je melatonin promotor sna (Gandi i sar., 2015), predloženo je da unos višanja (posebno koncentrata soka od višnje sa znatno većim količinama melatonina) može poboljšati kvalitetu sna.

U dvije sorte višnje "Hongdeng" (*Prunus avium* L. cv. Hongdeng) i u "Rainier" (*Prunus avium* L. cv. Rainier), količine melatonina variraju u periodu 24 h, kao i sa razvojem ploda (Zhao i sar., 2013). Maksimalna koncentracija melatonina noću postignuta je oko 05:00 h, a dnevna u kasnim popodnevnim satima, na najvišoj temperaturi i intenzitetu svjetla. Najviši nivo melatonina u "Hongdeng" višnji je iznosio oko 7,7 $\mu\text{g}/\text{g}$ svježe mase, dok su se u "Rainier" vrijednosti približile 20 $\mu\text{g}/\text{g}$. Količine melatonina su značajno varirale i u fazama razvoja ploda (Slika 3).

Dobijeni rezultati su pokazali da je količina melatonina bila najviša u drugoj fazi razvoja (period razvoja ploda i lignifikacije endokarpa). Tokom treće faze razvoja ploda količina melatonina je bila niska i obrnuto proporcionalna sa nivoima peroksidiranih lipida u plodu. Zbog obrnute proporcionalnosti između koncentracije melatonina i intenziteta lipidne peroksidacije (u fazi 3) i vrlo visokih količina tokom druge faze (kada je proizvodnja slobodnih radikala maksimalna), Zhao i saradnici (2013) su zaključili da melatonin funkcioniše kao antioksidans u plodovima višnje.



Slika 3. Prikaz (A) plodova višnje u različitim fazama razvoja, (B) koncentracije melatonina i malondialdehida (MDA), (C) gel koji pokazuje ekspresiju PaTDC gena (gena koji kodira triptofan-dekarboksilazu) i (D) i ekspresija gena po fazama razvoja ploda, (Zhao i sar., 2013).

Objavljen je i sličan odnos između procesa sazrijevanja jabuke (*Malus domestica Borkh. cv. Red*) i količine melatonina. Kao i kod trešnje, najviše količine melatonina koegzistirale su u periodu najbržeg rasta i povećane respiracije u jabuci, periodima najveće proizvodnje slobodnih radikala (Lei i sar., 2013). Opet, tu je i obrnuta povezanost između koncentracije melatonina i količine peroksidiranih lipida. Osim toga što se koncentracija melatonina dramatično mijenja tokom razvoja jabuke, ovdje se prvi put identificira melatonin u plodu jabuke.

3.3. Teški metali u zemlji

Teški metali su prelazni metali sa gustoćom preko 5 g/mL, a pokazuju izrazitu toksičnost po životnu sredinu (Abosedo, 2017). U okolišu se nalaze u zraku, vodi, hrani i zemljištu. Pojedini teški metali poput željeza, kobalta, bakra, cinka i mangana, neophodni su za brojne funkcije, normalan rast i razvoj živih organizama i označeni su kao esencijalni. Međutim, akumulacijom esencijalnih i neesencijalnih teških metala (kadmij, olovo, arsen, živa) u živim

organizmima reducira se normalan rast i razvoj, nastaju akutna trovanja, bolesti, te smrt organizama.

Zemljište je ključna komponenta ruralnih i urbanih sredina i često, upravljanje zemljištem je ključ za kvalitet zemljišta. Više od 235 miliona hektara zemljišta u svijetu zagađeno je teškim metalima. Njihovo porijeklo može biti prirodno (geohemijsko) i antropogeno (Alloway i sar., 1995). Do raspadanja stijena dolazi procesom pedogeneze, a hidratacijom, hidrolizom, rastvaranjem, oksidacijom ili redukcijom oslobađaju se teški metali iz matičnog supstrata. Jedan dio teških metala u zemljištu nastaje kao posljedica geohemijskih procesa, ali i vulkanskih erupcija i raznošenja kontinentalne prašine. U obliku čestica prašine dopijevaju u atmosferu i talože se u vodama i zemljištu. Sulfatna i lateritna zemljišta su bogata željezom, a tresetna cinkom. Na plavljenim područjima javljaju se povećane koncentracije željeza, mangana i molibdena (Zeremski, 2005). Teški metali talože se kao teško rastvorljivi karbonati, sulfati ili sulfidi, a njihova toksičnost se povećava procesom heliranja i stvaranja sulfida sa biološki aktivnim tvarima (posebno s enzimima) u procesu koji se označava kao biometilacija.

Izvori teških metala mogu biti i antropogenog porijekla i doprinosti njihovom širenju u ruralne oblasti i poljoprivredno zemljište (metaloprerađivačka industrija, galvanoindustrija, topionice ruda, kao i sagorijevanje fosilnih goriva, deponije urbanog i industrijskog otpada, kanalizacijski mulj). Toksičnim metalima poljoprivredno zemljište može biti zagađeno i u procesu đubrenja kanalizacijskim muljem (Cd, Ni, Cu, Pb, Zn), kao i primjenom fosfatnih i organskih đubriva (Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn i dr.), te pesticida (Cu, As, Pb) (Huttermann i sar., 1999), zbog čega primjena ovih sredstava mora biti pod strogom kontrolom, jer se teški metali u njima nalaze kao nečistoće. Zemljište tretirano takvim sredstvima se u razvijenim poljoprivrednim područjima podvrgava monotoringu na opterećenost toksičnim metalima.

3.3.1. Toksičnost jona Zn

Cink (Zn) je dvadestčetvrti najzastupljeniji element zemljine kore sa sadržajem od 75 mg/kg. Zemljište sadrži 5-770 mg Zn/kg sa prosjekom od 64 mg/kg, morska voda ima 30 µg Zn /L, a atmosfera 0,1-4 µg Zn/m³ (Emsley, 2001). Prema evropskom zakonodavstvu (EU direktiva 86/278/EEC) maksimalno dozvoljene koncentracije cinka kreću se u raponu od 150 do 300 mg/kg. Cink u okolišu uglavnom postoji u stanju cink-sulfida i cink-oksida i lako se povezuje sa mnogim drugim elementima (Pb, Cu i Cd) uz formiranje mineralnih spojeva. Najčešći

tipovi kompleksa cinka su tetra- i heksakoordinirani, iako postoje i pentakoordinirani kompleksi (Holleman i sar., 1985).

Zn je esencijalni element u tragovima za biljke (Broadley i sar., 2007), životinje i mikroorganizme (Prasad, 2008). Sastavni je dio enzima (naprimjer u probavnom sistemu učestvuju u razgradnji proteina). Joni Zn su često koordinirani na bočnim lancima aminokiselina (cistein i histidin, asparaginska i glutaminska kiselina). Kako Zn nema oksidirajuća svojstva kao željezo i bakar, postoji u dvovalentnom stanju, čime se lako ugrađuje u biološki sistem i sigurno transportuje u ćelije (Hambidge i Krebs, 2007).

Niske koncentracije Zn su neophodne za normalan rast biljaka. Međutim, jaka fitotoksičnost cinkom i usporeni rast biljaka pojavljuje se u prisustvu Zn preko 400 mg/kg. Neravnomjerno rast sadnica i hloroza lista nastaje u usjevima navodnjavanim kanalizacijom, uz otpadnu vodu koja sadži visoke količine Zn. Povećanjem sadržaja Zn smanjuje se raznolikost mikroorganizama u zemljištu kontaminiranom cinkom (Moffett i sar., 2003).

Cink igra središnju ulogu u biljnom metabolizmu i procesima rasta. Prenosi se u ksilem nakon apsorpcije iz korijena i distribuira u biljna tkiva. Neravnomjerno je raspoređen u biljkama, a koncentracije u tkivima su uvelike ovisne o biljnoj vrsti. U biljnim tkivima postoji u topivom i netopivom obliku. Karboksilne kiseline, aminokiseline, fitohelati, nikotianamin i proteini su jedinjenja koja grade komplekse sa topivim Zn (White i Broadley, 2011).

Koncentracije cinka u biljkama varira od 25 do 150 mg/kg suhe tvari. Simptomi folijarnog deficita Zn pojavljuju se pri koncentracijama <15 mg/kg suhe tvari u listovima, dok simptomi toksičnosti postaju vidljivi pri prelasku 300 mg/kg suhe tvari (Broadley i sar., 2007). Ipak, koncentracija u nadzemnim dijelovima može doseći i 1000 mg/kg kod biljaka tolerantnih na cink, pa čak i više od 10.000 mg/kg kod hiperakumulatora cinka.

Kao jedan od najvažnijih mikromineralnih elemenata, primarne fiziološke funkcije Zn u biljnim biohemijskim aktivnostima obuhvataju:

- učešće u ćelijskoj respiraciji biljaka, promoviranje fotosinteze povećanjem proizvodnje hlorofila,
- agens za aktiviranje vitamina,
- katalizaciju redoks reakcije i ubrzavanje oksidacije proteina,
- učešće u sintezi hormona rasta auksina u biljkama i
- poboljšanje rasta biljke s visokom otpornošću na bolesti i hladnoću (Alloway, 2008).

Cink može biti apsorbiran preko korijena primarno kao Zn^{2+} i/ili $Zn(OH)_2$ pri višim pH vrijednostima. Nakon apsorpcije u korijen transportuje se simplastično ili apoplastično (Broadley i sar., 2007).

Dostupnost Zn u zemljištu kontroliraju faktori koji utiču na količinu raspoloživog Zn u otopini zemljišta ili njegove sorpcije, odnosno desorpcije iz ili u otopinu zemljišta. Ti faktori su: ukupan sadržaj Zn, hemijski oblici jedinjenja Zn, svojstva zemljišta (sadržaj organske tvari, sadržaja karbonata ili fosfata, znatost, pH), okolišni uvjeti (temperatura i vlaga), koncentracije drugih elemenata u tragovima i relativna biološka aktivnost. Na niskim pH vrijednostima zemljišta (<6) njegova biodostupnost se povećava sa povećanjem zamjene Zn^{2+} sa H^+ (Pilon-Smits, 2005). Viša temperatura može ubrzati biohemijske procese u cjelini, tako da se apsorpcija i premještanje Zn mogu ubrzati. Organske tvari mogu ili povećati dostupnost Zn u zemljištu uz formiranje topivih organskih kompleksa koji su sposobni da apsorbiraju u korijen biljaka ili smanjuju njegovu biodostupnost formiranjem stabilnih čvrstih organskih kompleksa Zn (Alloway, 2008).

Procesi u rizosferi uključuju kompleksne interakcije između biljnog korijena i mikroba rizosfere. Korijeni biljaka oslobađaju različita organska jedinjenja (poput organskih kiselina i fenola) koji predstavljaju prirodni izvor ugljika za mikrobe. Istovremeno, mikrobi u rizosferi stimuliraju rast korijena i poboljšavaju apsorpciju vode i mikronutrijenata (Farinati i sar., 2009).

Većina Zn (primarno Zn^{2+}) nakon transmembranskog procesa helirana je od strane nekoliko helatora u citosolu ili skladištena u vakuoli, održavanjem zanemarivo niske koncentracije slobodnog jona Zn u citosolu. Ovaj mehanizam je glavni način detoksifikacije teških metala u biljkama, pridonoseći toleranciji prema metalima i hiperakumulaciju metala u biljkama. Puno helirajućih materijala je već otkriveno za biljke, a tri tipične grupe metalnih helatora su: metalotioneini (MTs), fitohelatini (FH) i niskomolekularni helirajući agensi (NH).

- 1) Metalotioneini su grupa niskomolekularnih polipeptida bogatih cisteinom nađenih u citoplazmi biljnih ćelija. Hidrosulfat rezidua cisteina može detoksificirati teške metale (Zn i Cd) formirajući netoksične ili niskotoksične komplekse (Nathalieal i sar., 2001). Također, iznimno je antioksidativno djelovanje metalotioneina, kao i njihova uloga u reparaciji oštećenja ćelijske membrane (Dietz i sar., 1999).
- 2) Fitohelatini su prvi put ekstrahirani iz ćelija *Rauvolfia serpentine* zagađenih kadmijem. Fitohelatini su vrsta hidrosulfatnih helirajućih polipeptida koji se sintetišu

iz glutationa sa cisteinom, glutamatom i glicinom, neophodnih za osnovnu toleranciju na metale u svim biljkama (Seregin i Kozhevnikova, 2006). Nekoliko sekundi nakon procesiranja teških metala, biljne ćelije će pokrenuti proizvodnju fitohelatina koji se transportuju u vakuolu uz formiranje i skladištenje kompleksa fitohelatina i metala.

3.3.2. Toksičnost jona Cd

Kadmij se po zastupljenosti u zemljinoj kori nalazi na 67 mjestu. Kao i cink, preferira oksidacijsko stanje +2 u većini svojih spojeva i poput žive pokazuje nisku tačku topljenja u odnosu na prijelazne metale. Kadmij nije uvijek smatran prijelaznim metalom, nema djelomično ispunjenu d ili f elektronsku ljusku u elementarnom ili uobičajenom oksidacijskom stanju. Cd u zemljištu potiče od prirodnih i antropogenih izvora. Prirodni izvori uključuju osnovni temelj kao što su glacijalne ravni i aluvijum. Glavni prirodni izvori za mobilizaciju Cd iz zemljine kore su vulkani i trošenje stijena. Naravno, vrlo velike količine Cd ispuštaju se u okoliš, oko 25.000 tona godišnje. Prosječna koncentracija kadmija u zemljinoj kori je između 0,1 i 0,5 ppm, navedene su i puno više i puno niže vrijednosti zavisno od nekoliko faktora. Eruptivne i metamorfne stijene imaju tendenciju prema nižim koncentracijama (0,02-0,2 ppm), dok sedimentne stijene imaju značajno više vrijednosti (0,1-25 ppm). Fosfata gnojiva sadrže od 10 do 200 ppm Cd (Cook i Morrow, 1995).

Prema Wagneru (1993), nezagađeni zemljišni medij sadrže koncentracije Cd u rasponu od 0,04 do 0,32 mM. Prema evropskom zakonodavstvu (EU direktiva 86/278/EEC) maksimalno dozvoljene koncentracije kadmija kreću se u rasponu od 1 do 3 mg/kg.

Razvojem moderne industrije i poljoprivrede u zemljištu je značajno povećana koncentracija Cd. Zagađenje zemljišta kadmijem važan je ekološki problem u svijetu s obzirom na toksično djelovanje na ljude (uzrokuje oštećenje i zatajenje bubrega, emfizem pluća i osteoporozu) (Albert i Hsu, 2005). Glavni izvori Cd u zemljištu su iz industrijskog otpada, otpadna voda koja sadrži Cd za navodnjavanje i pesticide, primjena herbicida i fosfatnih gnojiva. U Kini, Cd kontaminirano zemljište u 11 provincija i godišnja proizvodnja Cd kontaminirane riže (koja sadrži više od 1,0 mg Cd/kg riže) je oko $5 \cdot 10^4$ tona.

Među nekoliko zemljišnih parametara koji poznato utiču na dostupnost Cd, pH zemljišta je jedan od najvažnijih. Vrlo lako i brzo može da se apsorbuje iz podloge, a zatim da se kroz sistem ksilema transportuje kroz biljku. Kalcij i cink smanjuju apsorpciju kadmija. Ovo je

izuzetno toksičan element zbog svog visokog afiniteta za tiolne grupe (SH) u enzimima i drugim proteinima.

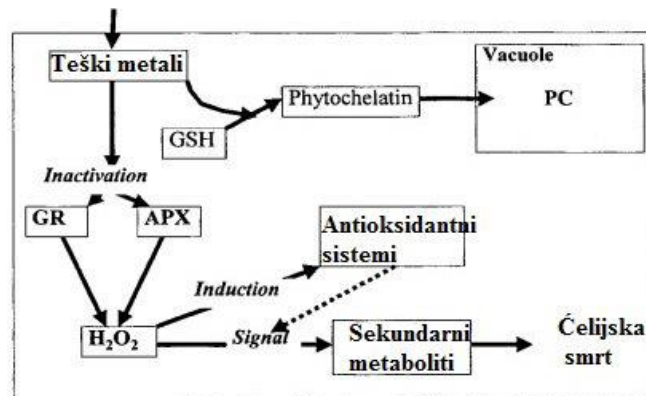
Visoke koncentracije kadmija u biljkama mogu poremetiti metabolizam željeza. Kod životinja može da ima kumulativni efekat i tako dovede do poremećaja metabolizma kalcija i fosfora, uzrokuje bolesti kostiju, respiratornih organa i nervnog sistema. Joni Cd nemaju poznate biološke funkcije u višim biljkama i veoma su toksični za biljke i životinje, a kritična koncentracija u tkivu je u rasponu od 3 do 10 mg/kg suhe mase. Biljke koje akumuliraju više od 100 µg/g Cd suhe mase u izdancima i listovima mogu biti kandidati za fitoremedijaciju Cd. Do sada je poznato šest vrsta hiperakumulatora Cd (tabela 3).

Tabela 3. Hiperakumulatori Cd i njihova akumulacija

Naziv biljke	Sadržaj Cd u izbojcima ili listu (mg/kg suhe mase)	Koeficijent obogaćenja (EC)	Faktor prijenosa (TF)
<i>Thlaspi caerulescens</i>	164 – 3000	>1	> 1
<i>Brassica juncea</i>	> 177	>1	>1
<i>Sedum alfredii</i>	> 100	>1	>1
<i>Solanum nigrum</i>	104 – 125	2,68	1,04 < TF < 1,27
<i>Viola baoshanensis</i>	465 – 2310	2,38	1,32
<i>Phytolacca acinosa Roxb</i>	200 – 482	2,02 < EC < 5,52	1,67 < TF < 2,25

Između vrsta, *T. caerulescens* akumulira najviše koncentracije Cd u listovima (>164 mg/kg SM). Međutim, efekat sanacije ograničen je zbog sporog rasta i male biomase. Iako su koncentracije Cd u izdancima *B. juncea* (oko 100 mg/kg suhe mase) niže od onih u *T. caerulescens*, *B. juncea* može ukloniti više Cd iz kontaminiranog zemljišta zbog svoje veće biomase (Pence i sar., 2000). Zhuang i saradnici (2007) u istraživanju su odabrali biljne vrste s visokom proizvodnjom biomase sa ciljem remedijacije zemljišta kontaminiranog s Pb, Zn, i Cd. Rezultati ukazuju da *Viola baoshanensis* akumulira 28 mg Cd/kg suhe mase u izdancima, sa biokoncentracijskim faktorom 4,8. Ukupna fitoekstrakcija je 0,17 kg Cd/ha, a oko 1% Cd se može ukloniti iz zemljišta, u usporedbi s drugom biljnom vrstom, *Rumex crispus*, koja je ekstrahovala 0,16 kg Cd/ha.

Joni Cd remete redoks ravnotežu u ćeliji. Zbog povećane potrebe za glutationom kao prekursorom u biosintezi fitohelatina, jedan od najočitijih bioloških odgovora na uticaj jona Cd kod biljaka je da u početku uzrokuje prolazno smanjivanje koncentracije redukovanog glutationa (GSH) (Schutzendubel i sar., 2001). Produženim uticajem Cd²⁺, GSH rezervoari se regenerišu, jer se pod takvim uslovima povećava potreba za sumporom. Inicijalno snižavanje nivoa GSH je u korelaciji sa inhibicijom antioksidantnih sistema (Schutzendubel i Polle, 2002) (slika 4).



Slika 4. Mehanizam djelovanja Cd na ćelijsku redoks homeostazu. GSH-glutation, GR-glutation reduktaza, APX-askorbat peroksidaza, PC-fitohelatini (Schutzendubel i Polle, 2002).

Cd svojom toksičnošću uzrokuje inhibiciju i abnormalnosti u rastu mnogih biljnih vrsta. Dugotrajnim izlaganjem Cd pojavljuje se smanjen broj izdanaka, izduživanje korijena i hloroza. Cd inhibira formiranje bočnih korijena, dok glavni korijen postaje smeđ, krut i iskrivljen (Rascio i Navari-Izzo, 2011). Glavni razlog pomenutim poremećajima je abnormalno proširenje epiderma i kortikalnih slojeva ćelije u apikalnoj regiji. Promjene u listu uključuju izmjene u ultrastrukturi hloroplasta, niskom sadržaju hlorofila, što uzrokuje hlorozu i ograničenu aktivnost fotosinteze (Tran i Popova, 2013). Rascio i saradnici (2008) objavili su da tretman sadnica riže sa Cd vodi inhibiciji rasta korijena i promjenama u njihovoj morfogenezi. U grašku, Cd također izaziva poremećaje izduživanja korijena i mitotskog procesa. Pri visokim koncentracijama Cd (250 μ M) poremećaji mitoze korijena graška se brzo javljaju, čak 24 h nakon tretmana (Siddiqui i sar., 2009). Različite vrste imaju različit biološki odgovor na uticaj Cd²⁺, a on zavisi i od starosti biljke, ispitivanog organa i vremena izloženosti Cd (Schutzendubel i Polle, 2002).

3.4. Reaktivne vrste kisika i oksidativni stres

Brojni faktori uzrokuju oksidativni stres u biljkama, pri čemu se, uglavnom u hloroplastima biljaka, stvaraju vrlo reaktivni oblici kisika (ROS), superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$), singletni kisik (1O_2), vodonik-peroksid (H_2O_2) i hidroksi radikal (HO^{\cdot}) (Harb i sar., 2015). Superoksid-radikal i H_2O_2 mogu stvarati vrste koje mogu da oštete osnovne ćelijske komponente. Reaktivne kisikove vrste nastaju u reakcijama fotosinteze, fotorespiracije, oksidativne fosforilacije i drugim procesima oksidacija. Zbog visoke toksičnosti ROS mogu dovesti do inaktivacije enzima, razaranja ćelijskih membrana, degradacije pigmenata, lipida, proteina igrajući važnu ulogu u signalizaciji kod biljaka u procesima rasta, razvoja, odgovora na biotičke i abiotičke faktore konačno dovodeći do ćelijske smrti (Harb i sar., 2015). Pri normalnim uslovima rasta biljke proizvode ROS, koji je u ravnoteži sa različitim antioksidansima ćelije, ali se u uslovima povećanog stresa povećava i ROS uz nakupljanje u biljnim ćelijama (Jovičić, 2014).

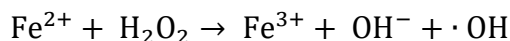
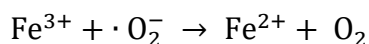
3.5. Uticaj teških metala na metabolizam biljaka

Teški metali su postali jedan od glavnih abiotičkih faktora sa negativnim djelovanjem na žive organizme. Konzumacijom, biljke imaju značajnu ulogu u kruženju toksičnih metala jer ulaze u lanac ishrane i tako negativno utiču na zdravlje ljudi. Na akumulaciju i dostupnost toksičnih metala posebno utiču tip zemljišta, pH vrijednost, kao i sadržaj organskih materija u zemljištu (Zeremski, 2005). Predstavljajući dijelove nekih enzimskih kompleksa i proteina esencijalni teški metali neophodni su za normalan rast i razvoj biljaka. Međutim, pomenuta akumulacija teških metala može biti posljedica vezivanja za SH grupe proteina i rezultirati inhibicijom enzimske aktivnosti, narušavanju njihove strukture, deficita esencijalnih metala i stimulacije proizvodnje slobodno-radikalskih vrsta i uzrokovanja oksidativnog stresa (Shah i sar., 2001). Akumulacija teških metala uzrokuje inhibiciju rasta nadzemnih i podzemnih dijelova, smanjenje klijavosti sjemena, smanjenje sadržaja fotosintetičkih pigmenata, nastanak hloroze i nekroze lista, gubitak turgora, što je u vezi sa ubrzanim procesima starenja i smrti same biljke. Toksični metali dovode do promjena u strukturi biljnog tkiva, te biohemijskim i molekulskim procesima (Štajner i Popović, 2008).

3.5.1. Teški metali uzročnici oksidativnog stresa u biljkama

Biljke su tokom svog životnog vijeka izložene raznim stresogenim faktorima (suše, ekstremni uvjeti temperature, povišen intenzitet svjetlosti, toksični metali, salinitet i smanjen sadržaj nutrijenata). Kod većine aerobnih organizama do povećane proizvodnje slobodnih radikalskih

vrsta dovode i faktori poput invazija patogena, UV i drugi oblici zračenja, zagađenje zraka, pesticidi, ozon i drugi (Malenčić i sar., 2010). Teški metali uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta različitim mehanizmima, i tako dovode do oksidativnog stresa čitave biljke (Trudić i sar., 2012).



ROS nastaju ekscitacijom kisika do singletne forme ($^1\text{O}_2$), ili redukcijom atmosferskog kisika prelaskom jednog, dva, ili tri elektrona na O_2 , stvarajući superoksid-radikal (O_2^-), H_2O_2 ili hidroksil-radikal ($\cdot\text{OH}$) (Kebert, 2014). Kako bi prevladale toksičnost teškim metalima, biljne ćelije su opremljene enzimskim mehanizmima za otklanjanje ili smanjenje njihovih štetnih efekata (Devi Chinmayee i sar., 2014). Tolerancija na teške metale dosad je najviše proučavana za jone Zn, Cu, Ni i Cd. Neki od metala se javljaju u različitim oksidacionim stanjima, kao npr. redoks-aktivni Cu^{2+} , dok su neki (Zn^{2+} i Cd^{2+}) redoks inertni, što također utiče na ispoljavanje njihovog toksičnog efekta.

3.6. Antioksidansi u biljkama

Biljke su tokom evolucije razvile odbrambene sisteme, koji se ogledaju u enzimskoj i neenzimskoj antioksidativnoj aktivnosti.

Enzimatski antioksidansi se klasificiraju u sljedeće grupe prema načinu njihovog djelovanja:

- Primarni, koji prekidaju lančanu reakciju slobodnih radikala doniranjem elektrona slobodnim radikalima uz nastanak stabilnih jedinjenja,
- Sekundarni koji uklanjaju oksidanse.

Akumulacija ROS i regulacija aktivnosti antioksidativnih enzima ovise o biljnoj vrsti, genotipu, vrsti i dužini trajanja stresa, razvoja biljaka i metabolizma.

Poznato je da brojni proteini djeluju u uklanjanju slobodnih superoksida i vodonik-peroksida. To su, između ostalih,

- superoksid dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1), enzim koji predstavlja prvu liniju odbrane protiv toksičnih oblika kisika, superoksid radikala (O_2^-) prevodeći ga do molekuskog O_2 i H_2O_2 ,
- katalaza (CAT, EC 1.11.1.6), nađen u svim živim organizmima, a katalizira reakciju razlaganja H_2O_2 do vode i kisika,

- peroksidaze (POD, EC 1.11.1.7), pripadaju grupi oksidoreduktaza i efikasno kataliziraju razgradnju H_2O_2 uz nastanak vode,
- askorbat peroksidaze (APX, EC 1.11.1.11), hemoprotein koji detoksificira vodonik-peroksid uz pomoć askorbata reakcijom nastanka dihidrogen-askorbata u hloroplastu i mitohondrijama,
- glutation reduktaze (GR) (Harb i sar., 2015).

U neenzimatske antioksidanse ubrajaju se vitamin C, fenoli i njihove kiseline, flavonoidi, karotenoidi, tokoferoli i drugi, a učestvuju u različitim mehanizmima u antioksidativnom djelovanju. Polifenolna jedinjenja najčešće učestvuju u neutralisanju slobodnih radikala, inhibiranju enzimskih sistema (oksidaza, ksantin-oksidaza, lipoksigenaza), heliranju jona prooksidativnih metalnih jona (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}) isl. Znatan dio antioksidativne aktivnosti biljaka pripisuje se fenolnim jedinjenjima, a zavisi od njihove strukture. Flavonoidi svoju antiooksidativnu aktivnost pokazuju u hidrofilnim i lipofilnim sistemima. Biosinteza i akumulacija fenolnih jedinjenja se kontroliše tokom rasta u zavisnosti od fiziološkog stanja biljke, a reguliše se vanjskim faktorima (svjetlost, temperatura, oštećenja i drugi uzročnici stresa) (Lampe, 1999).

3.7. Uloga melatonina

Melatonin je svestrana molekula sa iznimnim antioksidativnim svojstvima. Podaci o njegovoj zaštitnoj ulozi protiv oksidativnog stresa u ljudskom organizmu su mnogobrojni. Povećanjem dobi, povećava se i oksidativni stres, koji se javlja kao posljedica neravnoteže između procesa stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (slobodnih radikala) i antioksidativne odbrane organizma. Slobodni radikali, sa druge strane, nastaju kao rezultat pucanja veza unutar molekula u ćelijama organizma djelovanjem mnogobrojnih faktora poput izloženosti jonizirajućem zračenju, kao posljedica metaboličkih procesa, upala isl (Lobo i sar., 2010).

Tako naprimjer, istraživanja su pokazala da melatonin vrši antitumorsku aktivnost kako *in vivo* tako i *in vitro*, a može i poboljšati efikasnost tretmana raka kada se koristi u kombinaciji sa istim (Blask i sar., 2004).

Istraživači su proučavali efekte svjetlosne terapije i suplementacije melatonina u liječenju Alzheimerove bolesti. Pretpostavili su da pad u proizvodnji melatonina starenjem može doprinijeti mentalnom padu. Stoga, ponovno uspostavljanje cirkadijalnog ritma kroz korištenje suplemenata melatonina može biti od koristi (Wu i Swaab, 2005). Sposobnost

melatonina u uklanjanju slobodnih radikala je obećavajuća u preveniranju ili liječenju bolesti (Wu i Swaab, 2005), a upravo zbog sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, indirektna antioksidativne aktivnosti i svojih regulatornih efekata na enzime—povećanju antioksidativnih enzima i smanjenju pro-oksidativnih enzima (Tengattini i sar., 2008).

Melatonin je djelotvoran u imunološkom sistemu gdje povećava otpornost organizma na infekcije i bolesti. U sklopu antioksidativnih aktivnosti vezuje reaktivne kisikove vrste efikasnije od vitamina E i glutaciona, reguliše aktivnost antioksidativnih enzima kao što su peroksidaze, glutation reduktaze, superoksid dismutaze i katalaze (Reiter i sar., 2007). Utvrđeno je da melatonin inhibira meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonasa eruginosa* (pri koncentracijama 250 µg/mL i 125 µg/mL *in vitro*) (Tekbaş i sar., 2008). Zajedno sa SB-73, mješavinom magnezija, fosfata i masnih kiselina ekstrahiranih iz *Aspergillus sp.*, smanjuje neželjene efekte i skraćuje vrijeme zacjeljenja povreda kod herpes virusa (Nunes i Pereira, 2008).

Melatonin je jedan od najznačajnijih molekula zbog svojstva neutralizacije slobodnih radikala i antioksidativnih svojstava pri fiziološkim i farmakološkim koncentracijama *in vivo* (Hardeland i Pandi-Perumal, 2005; Reiter i sar., 2005b). Dalji dokaz smanjenja ROS je prikazan i hirurškim uklanjanjem pinealne žlijezde, što dodatno povećava oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (DNK) (Tan i sar., 1994). U eksperimentu je pokazano da su fiziološke koncentracije melatonina efikasne u smanjenju uništavanja DNK slobodnim radikalima (Tan i sar., 1994).

Posljednjih nekoliko godina, istraživači su više pažnje usmjerili na moguće zaštitne efekte melatonina slijedeći traumatske periferne povrede živaca, posebno bedrenog živca i njegovih patoloških stanja, jer melatonin postoperativno može imati terapijsko djelovanje. Dok neka istraživanja prijavljuju toksične efekte melatonina na regeneraciju perifernih nerava, većina naučnika prikazuje zaštitno djelovanje melatonina (Odaci i Kaplan, 2009).

Mnoge oksidativne bolesti uključuju disfunkciju apoptotskih procesa uključivanjem mitohondrije. Predloženo je da melatonin neutrališe kisikove i dušikove reaktivne vrste u mitohondrijima, što dovodi do poboljšanog mitohondrijalnog disanja i povećanja sinteze adenozin-trifosfata (ATP) tokom stresa, što zauzvrat može spriječiti apoptotičnu kaskadu (Leon i sar., 2005). Melatonin se onda može promatrati kao posredan regulator programirane ćelijske smrti. Na genomskom nivou, melatonin regulira ekspresiju gena djelujući na

antioksidativno djelovanje enzima i ćelijske mRNA nivoe enzima pod uvjetima bazalnog i povišenog stresa (Rodriguez i sar., 2004; Tomas-Zapico i Coto-Montes, 2005).

Značajne pozitivne efekte melatonin pokazuje i u biljkama. Budući da su biljke sesilne, one mogu samo prilagođavati svoje fizičke uvjete u odupiranju štetnom okruženju. Kada su izložene stresnom okruženju, unutar biljnih ćelija se mora desiti brza i ogromna promjena kako bi preživjele. Ćelija se odvaja iz okruženja fizičkom barijerom, plazma membranom. Melatonin je amfifilna molekula koja vrlo lako difundira kroz ćelijske membrane u citoplazmu i ulazi u subćelijske odjeljke. Teški metali poput Zn i Cu su esencijalni za normalan rast biljaka, ali višak metala je toksičan. Metalni jon veže se za sulfhidrilnu grupu u enzimima i drugim proteinima inhibirajući njihovu aktivnost ili remeteći njihovu strukturu. Nadalje, teški metali uzrokuju oksidativna oštećenja biomolekula tako što pokreću lančane reakcije posredovane slobodnim radikalima rezultirajući lipidnom peroksidacijom, oksidacijom proteina i nukleinskih kiselina (Zhang i sar., 2014). Melatonin je vrlo efikasan u direktnom uklanjanju slobodnih radikala, a indirektno kao antioksidans (zbog sposobnosti da stimulira antioksidativne enzime), pa autori istraživanja kontaminacije solima stavljaju naglasak na ideju da se korisno djelovanje melatonina vjerovatno može pripisati njegovoj sposobnosti da se odupre oksidativnom stresu. Povećani salinitet, međutim, ima druga negativna djelovanja na biljke koja nisu povezana sa slobodnim radikalima (Syvertsen i Garcia-Sanchez, 2014). Stoga, precizni mehanizmi koje melatonin koristi u očuvanju biljaka protiv toksičnosti visoke količine soli se tek trebaju potpuno definirati.

Teški metali postaju sve češći zagađivači zemljišta u industrijskim područjima. Često su kontaminirana zemljišta označena kao „zabranjena“. Kao alternativa, rast zelenih biljaka u kontaminiranom zemljištu koje uzimaju i tolerišu zagađivače je prihvaćeno sredstvo za čišćenje zemljišta, što je proces fitoremedijacije. Tan i saradnici (2007) ispitivali su da li će melatonin dodan u zemljište onečišćeno teškim metalom (bakar) usvojiti grašak iz zemljišta i tako postati otporniji prema apsorbovanom toksičnom metalu (u tom slučaju biljka bi mogla biti kandidat za fitoremedijaciju). U pilot istraživanju, prikazano je da biljke graška (*Pisum sativum*) gajene u zemljištu kontaminiranom bakrom pokazuje toleranciju prema metalu u slučaju kad je zemljište sadržavalo i melatonin. Ove činjenice pokazuju da biljke obogaćene melatoninom mogu imati značajan fitoremedijacijski kapacitet (Tan i sar., 2007a). Navedeno istraživanje nije pokazalo samo da dodani melatonin može biti koristan u povećanju fitoremedijacijskog kapaciteta biljaka, nego da i indol očito štiti grašak kod izlaganja bakrom u zemlji.

U *in vivo* istraživanju Posmyk i saradnici (2008) su koristili sjeme krastavaca (*Cucumis sativus* L. var. Odys) kako bi potvrdili zaštitno djelovanje melatonina pri niskim temperaturama. Inkubiranje sjemena u rastvor melatonina povećalo je klijanje na 10°C i smanjilo stepen lipidne peroksidacije ćelijskih membrana. Kao i u prethodnom istraživanju u kojem je korišten melatonin u zaštiti od toksičnosti bakra (Posmyk i sar., 2008), povećane količine melatonina su ustvari otežale oksidativno oštećenje ćelijskih proteina krastavca, uzrokovano niskim temperaturama (Posmyk i sar., 2009).

Iako brojna istraživanja prikazuju pozitivan efekat melatonina na antioksidativni kapacitet biljaka, još uvijek nije poznat tačan reaktivni mehanizam. Međutim, postoji nekoliko mogućnosti koje objašnjavaju povezanost melatonina sa antioksidativnom sposobnošću biljaka. Naime, poznato je da melatonin direktno može da uklanja ROS (Tan i sar., 1993), povećavajući antioksidativni kapacitet biljaka (Boccalandro i sar., 2011), ili stimulirajući zaštitne antioksidativne enzime (Zhang i sar., 2014). Isto tako, melatonin poboljšava antioksidativnu sposobnost biljaka povećavajući akumulaciju polifenola.

3.7.1. Uticaj stresa na sintezu biljnog melatonina

Pokazalo se da i biotički i abiotički stres povećavaju sintezu melatonina u biljkama. Rast melatonina pod stresnim uvjetima pomaže u ublaživanju negativnih posljedica stresa, posebno oksidativnog stresa u biljkama. Naravno, bilo koja vrsta stresa ugrožava rast biljaka što potpomaže nastanku reaktivnih kisikovih vrsta uključujući i slobodne radikale. Dobro poznato svojstvo melatonina u životinjama i biljkama je velika efikasnost u poništavanju neželjenog djelovanja toksičnih derivata kisika zahvaljujući sposobnosti melatonina da ih neutrališe (Govender i sar., 2014). Prisustvo melatonina povećava otpornost biljaka prema stresu što pomaže u njihovoj sposobnosti u preživljavanju i rastu.

3.7.1.1. Melatonin štiti biljke od biotičkog i abiotičkog stresa

Jedna od posljedica povišenih stakleničkih plinova je promjena u vremenskim modelima koji se javljaju duži vremenski period, što znatno utiče na biljni ekosistem. Ove klimatske promjene uključuju visoke ili niske temperature i promjene u dostupnosti vode zbog čestih oluja ili suša (Dolferus, 2014). Biljke se moraju adaptirati tim promjenama kako bi preživjele. Melatonin je molekula koja im izgleda pomaže u otporu prema nekim promjenama u biljnom okruženju.

Neki od abiotičkih stresova koji indukuju oksidativni stres u biljnim ćelijama uključuju zagađivače zraka i zemljišta, visoke i niske temperature, visok intenzitet svjetlosti itd. Grupa istraživača je ispitala nekoliko faktora u skladu sa sposobnošću da utiču na količine melatonina u korijenu ječma i lučici (Zhu, 2001). U prijašnjim istraživanjima na korijenu ječma primjenjeni su hemijski agensi, natrijev-hlorid (NaCl), cink-sulfat (ZnSO₄) ili H₂O₂, te nakon 72 h određivan je sadržaj melatonina u cijeloj biljci. Svaki od ovih spojeva uzrokovao je značajan porast u koncentraciji melatonina uz stimulativnije djelovanje ZnSO₄ i H₂O₂ od NaCl (Arnao i Hernandez-Ruiz, 2009b). Rezultati su zavisili od količine toksina i vremena izloženosti. Regulirane količine melatonina zaštitile su biljke od pomenutih hemijskih agenasa.

Suša uzrokuje gubitak značajne količine mnogih komercijalno bitnih usjeva. Wang i saradnici (2013) su prvi dokumentovali ulogu melatonina u uslovima ograničene količine vode. Autori su jednogodišnjim, u stakleniku gajenim, stablima jabuke (*Malus domestica* Bokh.) smanjili količinu vode za 50% uz dodatak 100 µM rastvora melatonina polovini biljaka (dodan u medij rasta u trenutku dodavanja vode). Posljedice suše su praćene starenjem lista. Suša je ubrzala pojavu starenja listova na stablima jabuke. Promjene su uključivale i povećanu razgradnju hlorofila, regulaciju gena povezanih sa starenjem itd. Konačno, ove promjene su bile smanjene ili potpuno spriječene kod melatoninom tretiranih stabala. Tretman melatoninom suzbio je stvaranje H₂O₂, poboljšao aktivnost antioksidativnih enzima, kapacitet askorbat-glutation ciklusa, te je jedini logičan zaključak da antioksidativno djelovanje melatonina igra zaštitnu ulogu protiv suše.

Jedino istraživanje u ispitivanju imunocitohemijske lokalizacije melatonina i serotoninina u biljkama vršili su Mukherjee i saradnici (2014). Istraživanje je otkrilo da su ova jedinjenja različito raspoređena u primarnom korijenu sadnica suncokreta (*Helianthus annuus*). Izlaganje 120 mM NaCl povećalo je količine melatonina i serotoninina. Izlaganje soli uzrokovalo je i 72% rast HIOMT (hidroksiindol-O-metil transferaze) aktivnosti u kotiledonima. Kako je ovaj enzim odgovoran za formiranje melatonina, njegova izmijenjena aktivnost vjerovatno objašnjava povećane koncentracije melatonina. Međutim, kako sinteza melatonina u epifizi crpi serotonin nasuprot današnjim istraživanjima u kojima su te količine povišene pod većim salinitetom, povećanje ovog jedinjenja očito zahtjeva nezavisan proces posredovan sa NaCl. Sadnice grožđa se obično uzgajaju u semiaridnim područjima u dobro dreniranim zemljištima. Zbog toga su ove biljke često izložene uvjetima suše i bilo koji metabolički proces kojim bi se

efektivno povećala otpornost grožđa, kao i mnogih drugih biljaka, bio bi od kritičnog interesa za vinogradarsku industriju.

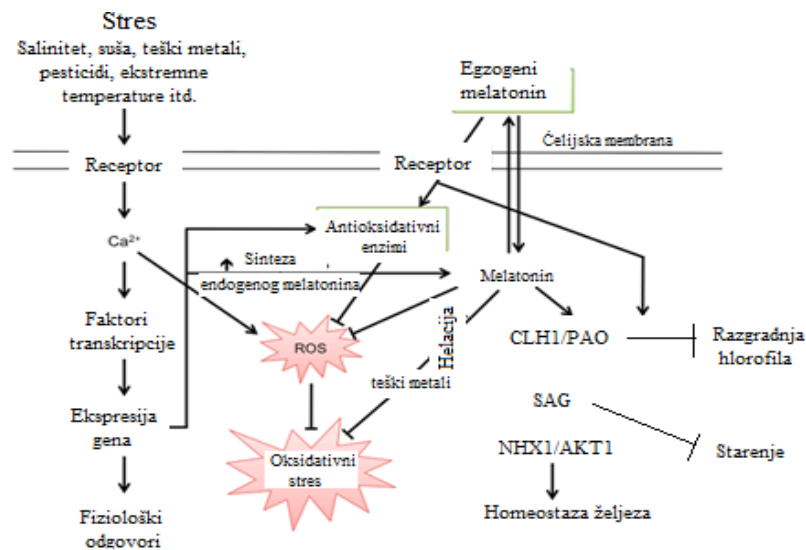
Meng i saradnici (2014) su izveli istraživanje u kojem su koristili reznice jednogodišnjih sadnica grožđa (*Vitis vinifera*) kako bi utvrdili da li će melatonin biti koristan za vrijeme suše. Reznice su gajene u mediju koji sadrži kombinaciju vrtnog zemljišta, vermikulita i humusa, te su podvrgnute djelovanju polietilenglikola u trajanju od 12 dana sa ili bez dodatka melatonina. U odsustvu melatonina manjak vode je značajno limitirao rast reznica, izazvao oksidativna oštećenja mjerena porastom nivoa malondialdehida (zbog nastanka $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2), te smanjio efikasnost Fotosistema II smanjenjem koncentracije hlorofila. Dodatak melatonina smanjuje sve promjene promatrane nakon dodatka samo polietilenglikola. Melatonin je značajno pomogao u očuvanju morfologije hloroplasta. Autori su zaštitno djelovanje melatonina pripisali direktno uklanjanju slobodnih radikala i indirektno stimuliranju antioksidativnih enzima. Očuvanje morfologije hloroplasta, hlorofila i efikasnost Fotosistema II su rezultati zbog kojih će melatonin vjerovatno imati primjenu u vinogradarstvu (Meng i sar., 2014).

Kako je i prikazano u predstavljenim istraživanjima melatonin ne samo da štiti biljke za vrijeme suše već i pomaže biljkama u oporavku nakon suše i ponovnog dodavanja vode. Očito, sposobnost prilagodbe tim periodima redukcije vode je pomoć u preživljavanju biljaka.

Ultraljubičasto svjetlo visokog intenziteta stvara slobodne radikale u tkivima životinja i biljaka izloženih tom zračenju. Izlaganjem biljke kineski sladić jakom ultraljubičastom svjetlu za nekoliko puta povećane su količine melatonina u korijenu. Autori su pretpostavili da je porast melatonina u svrhu zaštite biljnih tkiva od oksidativnog stresa izazvanog slobodnim radikalima proizvedenim izlaganjem ultraljubičastom zračenju. Ova posebna biljka je korištena zbog svojih antivirusnih i antitumornih ljekovitih svojstava. UV zračenje postaje akutni problem u uništavanju ozonskog sloja u donjoj stratosferi što dozvoljava tim talasnim dužinama (koje su se ranije filtrirale) da udare u zemlju u većim razmjerima. Prema istraživanju, biljke koje nastanjuju teren ispod ozonske rupe mogu imati veće endogene količine melatonina nego ista biljka uzgajana drugdje. Koristeći isto obrazloženje, moguće je i da biljke rasle na velikim visinama, sa povišenim UV zračenjem, mogu imati veće koncentracije melatonina kao sredstvo zaštite (Afreen i sar., 2006).

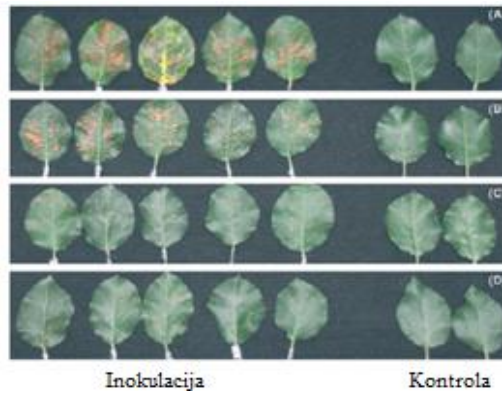
Slika 5 prikazuje višestruki značaj melatonina u smanjenju abiotičkog stresa u biljkama. Ovi stresori uzrokuju niz aktivnosti koje vode povećanoj proizvodnji toksičnih reaktivnih spojeva

kisika i starenju. Istovremeno, stres povećava sintezu antioksidativnih enzima i endogenu proizvodnju melatonina koji imaju za cilj da štite biljku. Receptori melatonina su uključeni u ćelijsku membranu, međutim, ovi receptori dosada nisu dokumentovani.



Slika 5. Negativni uticaj abiotičkog stresa na biljnu fiziologiju CLH1 (hlorofil)/PAO (poliamid oksidaza) = geni uključeni u degradaciju hlorofila; NAX1/AKT1 (serin/treonin kinaza 1) = geni povezani sa jonskim kanalima; SAG (S-arestin) = geni uključeni u proces starenja (Reiter i sar., 2015).

Jedan od primjera pozitivnog djelovanja melatonina na biotički stres je smanjenje negativnog uticaja fitopatogene gljive, *Diplocarpon mali*, koja širi zvjezdastu pjegavost jabuke i predstavlja ozbiljno gljivično oboljenje. Ovo stanje uzrokuje da stabla prerano izgube listove što kompromitira čvrstoću drveta i smanjuje prinos (Donghoon i sar., 2011). Gljiva napada listove, ali i plod. Na listovima *Malus prunifolia* ispitana je efikasnost melatonina kao inhibitora zvjezdaste pjegavosti. Autori su pokazali da pretretman stabala jabuke melatoninom poboljšava njihovu otpornost prema gljivicama inokulisanim stablima, koja su bez melatonina požutila.



Slika 6. Fenotipovi lista jabuke 20 dana nakon tretmana sporama Marsonine (Yin i sar., 2013).

Na slici 6 prikazani su kontrolni listovi drveta jabuke netretirani sporama Marsonine i listovi inokuliranih stabala koja su bila zalijevana (A) vodom bez melatonina; (B) 0,05 mM; (C) 0,1 mM ili (D) 0,5 mM rastvorom melatonina. Pozitivan efekat melatonina protiv biotičkog stresa podržavaju i druga mjerenja (ukupan broj lezija, efikasnost fotosistema II, sadržaj hlorofila, intracelularne količine H_2O_2 i povećana aktivnost enzima). Autori vjeruju da korištenje melatonina u pretretmanu može biti efikasna strategija u smanjenju gljivične infekcije. Mehanistički kako melatonin osigurava sticanje otpornosti i dalje zahtjeva pojašnjenje (Yin i sar., 2013).

3.7.2. Melatonin i starenje biljaka

Zavisno od vrste, različiti unutarnji i vanjski faktori određuju stopu starenja lista - fiziološki reguliranog procesa. Izumiranju lista prethodi degradacija hlorofila, gubitak molekularnog integriteta, relokaciju nutrijenata preko floema, promjene u fitohormonima (auksin, citokinini, abscisinska kiselina, etilen i jasmoninska kiselina), narušavanje strukture ćelijskih zidova peteljki i konačno ćelijska smrt (Lim i sar., 2007).

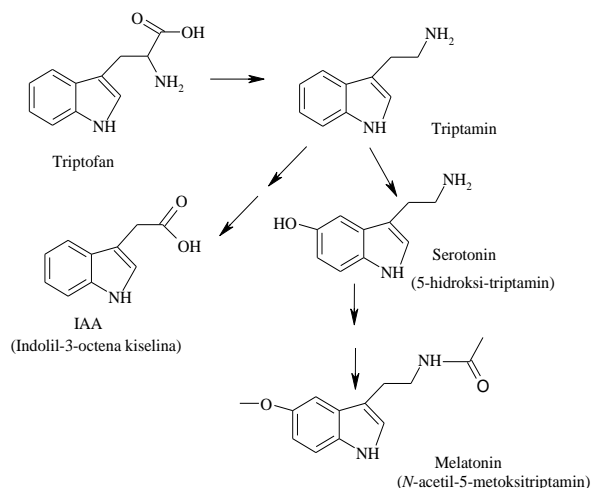
U nizu temeljitih istraživanja, Wang i saradnici (2012) su pojasnili ulogu melatonina u sprečavanju starenja lista. Kod listova jabuke odvojenih od stabla, držanih u mraku kako bi se izazvalo brže starenje, tretiran sa 10 mM melatoninom je usporio degradaciju hlorofila i održana je efikasnost Fotosistema II. Štoviše, melatonin inhibira ekspresiju gena za ključni enzim koji razgrađuje hlorofil (feoforbid a oksigenaza) i inhibira sa starenjem povezani gen 12, koji pridonosi odgođenom starenju u melatoninom tretiranim listovima. Akumulacija H_2O_2 inhibirana je egzogenim melatoninom, što je moglo rezultirati uklanjanjem reaktivnih kisikovih vrsta melatoninom i povećanjem aktivnosti askorbat peroskidaze (APX; EC

1.11.1.11). Pretpostavlja se da su uočene promjene posljedica povećane antioksidativne sposobnosti melatonina (Wang i sar., 2012).

In vivo istraživanje u kojem su biljke jabuke rasle u zemljištu uz redovni dodatak melatonina također aktivira promjene u skladu s odgođenim starenjem. Pokazalo se da melatonin usporava degradaciju proteina, održava znatno veću aktivnost fotosistema II, mjerenu preko nivoa hlorofila kao i tri fotosintetska krajnja proizvoda (sorbitol, saharoza i škrob). Melatoninom tretirani listovi su također imali povećan sadržaj dušika, povećanu koncentraciju ukupnih topivih proteina i povećanu koncentraciju *Rubisco* (Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaza) proteina. Ovo istraživanje jasno pokazuje veliki broj pozitivnih metaboličkih djelovanja melatonina u biljkama i svi bi mogli pridonijeti njegovoj sposobnosti u odgađanju procesa starenja (Wang i sar., 2013b).

3.7.3. Melatonin poboljšava rast biljke

Neke od funkcija melatonina u biljkama slične su onima kod životinja (njegove redoks funkcije), dok druge izgleda da su bitno drugačije, kao naprimjer promocija rasta (Kolar i Machackova, 2005; Paredes i sar., 2009; Shi i sar., 2015). Indolni spojevi izvedeni iz triptofana su uobičajeni u biljkama. Ti spojevi uključuju indolil-3-octenu kiselinu (IAA), koja, između ostalih funkcija, djeluje kao promotor rasta (Sauer i sar., 2013). IAA i melatonin (derivat triptofana) imaju izrazito slične molekularne strukture i, budući da molekule sa sličnim strukturama često imaju i slične funkcije, pretpostavljalo se da melatonin ima aktivnost u biljkama sličnu auksinu. Melatonin i IAA imaju indolni prsten, ali se razlikuju u pogledu broja pridruženih supstituenata (slika 7). Melatonin ima acetilnu grupu na poziciji 3 i metoksi grupu na poziciji 5 indolnog prstena, a IAA ima karboksilnu grupu na poziciji 3.

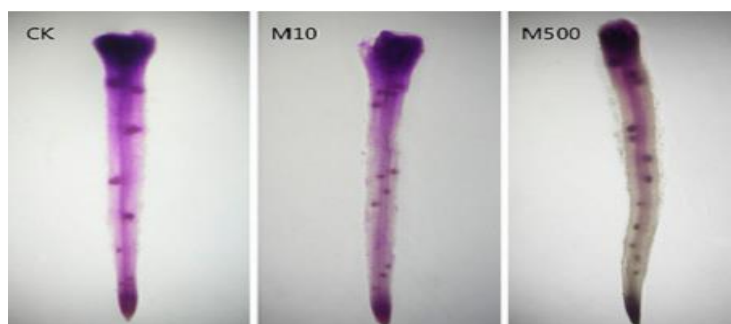


Slika 7. Triptofan-uobičajeni prekursor auksina indolil-3-octene kiseline i melatonina u biljkama (Sauer i sar. 2013)

Veliki broj slučajeva u kojima melatonin poboljšava parametre rasta u biljkama nisu potpuno definirani (Paredes i sar., 2009; Arnao i sar., 2014). U tom smislu, pokazalo se da melatonin ima aktivnost nalik auksinu. Kao primjer, kod hipokotila vučike (*Lupinus albus*) melatonin pomaže u povećanju rasta. Ovaj stimulacijski efekat bio je oko dvije trećine aktivnosti od IAA (Hernandez-Ruiz i sar., 2004). Slični rezultati objavljeni su i na četiri monokotiledona i to kod pšenice (*Triticum aestivum* L.), zobi (*Avena sativa* L.), ječma (*Hordeum vulgare*) i kanarske trave (*Phalaris canariensis* L.). Djelovanje melatonina na rast i koleoptila i korijena poređeno je sa djelovanjem IAA. Ispitan je uticaj melatonina i IAA u rasponu koncentracija od 0,01 do 100 μ M. Dok je melatonin potaknuo uzdužni rast koleoptila, stimulirajuće djelovanje je bilo manje od onog uzrokovano od strane IAA (Hernandez-Ruiz i sar., 2005). Također, većina označenih promotivnih djelovanja melatonina bila su ovisne o dozi i vrlo specifična za svaku biljku. Isto tako, pri najvišoj koncentraciji, melatonin postaje otrovan za biljke, jer je inhibiran rast koleoptila. Najveće koncentracije izmjerene su u pšenici, a najniže u kanarskoj travi.

Okazaki i saradnici (2009) su povećavali količine melatonina u listovima transgenog paradajza ekspresijom AANAT (Akrlamin *N*-acetil-transferaza) enzima, čija je aktivnost obično u korelaciji sa koncentracijama melatonina. Listovi nekih od ovih biljaka su imali veoma povećane koncentracije melatonina (do 7 puta veće u odnosu na kontrolu). Iako su listovi izloženi ekstremno visokim količinama melatonina, autori posebno ne ističu nikakve značajne fenotipske promjene uočene u strukturi lista (Okazaki i sar., 2009). To je u skladu s ranijim zapažanjima gdje klice kantariona (*Hypericum perforatum* L.), sa povišenim nivoima melatonina, proizvedenim *in vitro*, imaju morfološke karakteristike slične divljem tipu (Murch i Saxena, 2006).

Izvršen je pokušaj u definiranju gena reguliranih melatoninom koji određuju bočni rast korijena krastavca, budući da je genomski slijed ove vrste poznat. Korišteno je RNK (ribonukleinska kiselina) sekvencioniranje poznato iz ranijih istraživanja u pronalaženju potencijalnih mehanizama indukcije rasta bočnog korijena (Cheni sar., 2009; Sarropoulon i sar., 2012). Sjemenke su potopljene u 10 μ M ili 500 μ M rastvoru melatonina i klijale u 100 mM rastvoru NaCl, 48 sati. Rezultati su pokazali da sa peroksidaznom aktivnošću povezani geni vjerojatno povezani s stimulativnim djelovanjem melatonina na rast bočnih korijena (slika 8).



Slika 8. Stimulativni efekat melatonina u koncentracijama od 10 (M10) i 500 μ M (M500) na izduživanje bočnih korijena (tamne tačkice). CK-kontrola (Zhang i sar., 2014).

Međutim, geni koji se odnose na formiranje ćelijskog zida, metabolizma ugljikohidrata, procese oksidacije i redukcije i katalitičku aktivnost također su pokazali promjene u ekspresiji. Te promjene onemogućuju identifikaciju konačnog procesa kojim melatonin posreduje svoje djelovanje na izduživanje bočnog korijena (Zhang i sar., 2014).

3.8. Biljne vrste obuhvaćene istraživanjem

3.8.1. Matičnjak (*Melissa officinalis* L.)

Rod *Melissa* zastupljen je s jednom vrstom, *M. officinalis* L. koja se dijeli na dvije podvrste: subsp. *officinalis* L. i subsp. *altissima* (Sibth. & Sm.) Arcang. Ova višegodišnja, aromatična, ljekovita, medonosna i začinska biljka poznata je u više naziva (matičnjak, miloduh, gornik, matočina, pitoma i pčelinja metvica), a osim u medicini, koristi se i kao začin u kulinarstvu, te u parfumeriji. Ljekoviti matičnjak se uzgaja u Sredozemlju, srednjoj Europi i Aziji (Hornok, 1992). Javlja se po ivicama šuma, šikarama, grmlju, ili oko naselja uz ograde (slika 9).



Slika 9. *Melissa officinalis* L. na oglednoj parceli

Korijen matičnjaka je tanak i žiličast, razgranat, dubok. Stabljike su zeljaste, uspravne, četverbridne, razgranate sa polugrmom visine 50-120 cm. Listovi su jajoliki do srcoliki, nazubljenog ruba, jarko zelene boje, a cvjetovi bjelkasti i klasoliki na vrhovima stabljiki (slika 10). Biljka cvjeta od početka juna do sredine jula. Sporo klija, oko 4 sedmice do nicanja. Sjeme dozrijeva do sredine avgusta, a starenjem sjemena klijavost opada.

Skoro svo eterično ulje sadržano je u listovima, ali cijeli nadzemni dio biljke ima karakterističan miris na limun (Pahlow, 1989). Sadržaj eteričnog ulja je vrlo mali, 0,1-0,3%, a u izrazito povoljnim klimatskim uvjetima s visokim temperaturama iznosi oko 0,39%. Hemijski sastav eteričnog ulja čine monoterpenoidni aldehidi, alkoholi, ketoni i esteri (geranial, neral, citronelal, geraniol, nerol, citronelol, linalol, geranial-acetat, metil-citronelat i dr.) (Abdellatif i sar. 2014). Uz eterična ulja u hemijskom sastavu matičnjaka nalaze se: flavonidi (kvercitrin, ramnocitrin, glikozidi luteolina, apigenina i kaemferola), triterpeni (ursolna i oleanolna kiselina), fenolpropanoidni glikozidi, fenolne kiseline (ružmarinska kiselina oko 6%), steroli, soli i gorke tvari.



Slika 10. *Melissa officinalis* L. Köhler, F.E. (1887): Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica

Ljekovito djelovanje matičnjaka spominje se već 372. godine p.n.e. sa spazmolitičkim, antibakterijskim i antigljiivičnim djelovanjem, te relaksirajućim djelovanjem na mišiće. Vodena iscrpina ima antivirusni, odnosno virustatični efekat, posebno na virus Herpes

simplex, a djeluje i kao antioksidans, gdje poseban efekat imaju tanini, ružmarinska kiselina i derivati kafeine kiseline koji vezajući se na virus sprečavaju njegovo prodiranje u nove ćelije (Toplak - Galle, 2005.) Zbog najpoznatijeg umirujućeg djelovanja matičnjak se preporučuje kod nervoze, nesаницe, melanholiје, depresije, migrena, neurotičnih smetnji srca, nervoze želuca, kod nadutosti i grčeva u želucu i crijevima, pomanjkanja apetita, naročito kod djece. U narodnoj medicini upotrebljava se još kod prehlada, glavobolja, zubobolja, reume, smetnjama cirkulacije, anoreksiji, te problemima sa disanjem (Lawles, 1988).

Matičnjak kao samonikla biljka raste u različitim klimatskim uslovima u cijeloj Evropi. Može se gajiti svuda, jer nema posebnih zahtjeva u vezi vremenskih prilika. Mjesta sa nadmorskom visinom preko 1000 m nisu pogodna za njegovo gajenje. Također, zbog skolonosti matičnjaka da obolijeva od bolesti lista, preporučuju se osunčane i pozicije sa dobrom cirkulacijom zraka. Matičnjak treba gajiti na zemljištima dobre plodnosti. Biljka ne podnosi jako teška i vlažna zemljišta, a najbolje uspijeva na umjereno vlažnim i rastresitim, humusnim zemljištima, neutralne do slabo kisele reakcije.

Matičnjak, kao višegodišnja kultura, na istom zemljištu ostaje 5-6 godina. Nema naročitih zahtjeva u pogledu prethodnog usjeva. Iako se kao najbolji predušjev smatra krompir, onaj usjev za koji je zemljište dobro đubreno stajnjakom, u plodored može doći iza strnih žita, okopavina ili industrijskih biljaka.

3.8.2. Valerijana, odoljen (*Valeriana officinalis* L.)

Naziv valerijana nastao je ili od Valerijusa, koji je prvi koristio biljku u medicinske svrhe, ili iz latinskog termina „valere“, što znači zdravlje i dobrobit. Medicinski se koristi najmanje 2000 godina (slika 11).



Slika 11. *Valerijana officinalis* L. na oglednoj parceli

Ime valerijana se prvi put spominje oko 9. i 10. stoljeća, a ulazi u knjige kućnih lijekova još u 11. stoljeću. Prvi put se koristi kao terapija za epilepsiju krajem 16. stoljeća, od strane Fabius Columna. Usljedili su brojni izvještaji raznih pisaca, a valerijana se kasnije rutinski koristila za liječenje raznih poremećaja nervnog sistema (Flückiger i Hanbury 1879).

Valerijana je višegodišnja zeljasta biljka koja prve godine obrazuje samo rozetu, a tek druge daje cvjetonosnu stabljiku, visoku 1-2 m. listovi su tamniji od stabljike sa slženim perastim obodom. Donji listovi imaju lisnu dršku, a gornji su sjedeći. Valerijana cvjeta u junu i julu i daje sitne, bijele ili blijedoružičaste cvjetove. Sjeme je vrlo sitno, tamnosmeđe, dugačko 2,5 do 3 mm, a široko 1 do 1,2 mm (slika 12).

Korijenov sistem se sastoji od rizoma dugačkog 3–5 cm, iz kojeg se razvijaju mnogobrojni horizontalni kratki izdanci. Korijen je blijedožut, specifičnog i neprijatnog mirisa, koji je naročito intenzivan kada je suh.



Slika 12. Valerijana (*Valeriana officinalis* L.), Köhler, F.E. (1887): Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica

Valerijana sadrži preko 150 hemijskih jedinjenja, većinom fiziološki aktivnih. Varijacije u hemijskim komponentama u biljkama nastaju usljed različitih metoda obrade, različitih izvora i načina čuvanja. Primarni aktivni sastojci dijele se u četiri kategorije:

1. esencijalna ulja i njihovi seskviterpeni (valerinska kiselina),

2. iridoidi (iridoidni estri, valepotriati, valtrati, izovaltrati, dihidrovaltrati i izovalerohidroksi-dihidrovaltrat i njihovi proizvodi degradacije),
3. aminokiseline (arginin, glutamin, tirozin, gama-aminomaslačna kiselina-GABA) i
4. alkaloidi (Upton, 1999).

Rizom i korijen valerijane u prosjeku sadrže 0,5-1% etarskog ulja. Većina farmakopeja propisuje standarde da droga mora sadržati najmanje 0,5% etarskog ulja a valerijansku kiselinu i njene derivate ne manje od 0,17% (European Pharmacopoeia, 2005). Smjesa monoterpenkih (kamfen, pineni, borneol i njegovi estri bornilizovalerijanat, bornilacetat i bornilformijat) i seskviterpenkih derivata sadržana je u etarskom ulju valerijane. Sadrži i neisparljiva monoterpenka jedinjenja, iridoide (valtrat, izovaltrat, acevaltrat). Podzemni organi sadrže visoku količinu valepotrijata, dok su manje količine prisutne u nadzemnim dijelovima biljke. Valepotrijati su vrlo nestabilni u prisustvu vlage, na povišenoj temperaturi i u prisustvu kiselina i baza upravo zbog svoje estarske strukture. Alkaloidi valerijane, koji pokazuju in vitro holinesteraznu aktivnost koja nije dokazana na životinjama i ljudima, prisutni su u malim količinama (valerianin i aktinidin). Hidroksipinorezinol je lignan čiji se mehanizam djelovanja zasniva na vezivanju za benzodiazepinske receptore u amigdali i smatra se da djeluje sinergistički sa bornil acetatom, valerijanskom kiselinom i valepotrijatima u ostvarivanju sedativnog djelovanja valerijane (Bradley, 1992).

Grčki ljekar, Dioskorid, preporučio je korijen valerijane za liječenje bezbrojnih poremećaja uključujući lupanje srca, probavne probleme, epilepsiju i infekcije urinarnog trakta. U drugom stoljeću prepoznata je kao lijek za nesanicu. Primjena valerijane počela je 1883. godine opisom koji bi se mogao prihvatiti i danas: „Valerijana je blagi stimulans, sa posebnim djelovanjem na nervni sistem. U velikim dozama proizvodi osjećaj težine i tupu glavobolju sa nekoliko drugih efekata koji ukazuju na nervni poremećaj. Ulje uzeto u većim količinama proizvodi tupost, pospanost koja završava dubokim snom, smanjen puls i povećava protok urina. To je korisno u slučajevima nepravilnog rada nervnog sistema, koji nije povezan sa upalom, ili uzbuđenim stanjem sistema. Stanja pri kojima se valerijana posebno preporučuje su histerija, hipohondrijaza, epilepsija, hemikranija i blagi oblici groznice zajedno sa nemirnom, morbidnom budnošću, ili drugim nervnim poremećajem. Kako aktivne komponente valerijane ostaju uglavnom u nestabilnom ulju, lijek ne treba davati u vidu ekstrakta“.

Primjenjuje se kao sedativ, blago sredstvo za umirenje, hipnotik, spazmolitik, karminativ, hipotenziv (The British Herbal farmakopeja, 1983). U drugom izvoru se navode tri glavna područja korištenja valerijane: nervima izazvano uzbuđenje, nesanica i palpitacije. Jedinjenja valerijane opuštaju stimulirane mišićne ćelije djelujući kao muskulotropni agens, ali ne reagirajući sa receptorima autonomnog nervnog sistema (Hazelhoff, 1982).

Raniji radovi ukazuju da valerijana ima antidepresivna svojstva na centralni nervni sistem i antispazmodičku aktivnost. Farmakološka istraživanja valerijane i nekih drugih jedinjenja esencijalnih ulja *Valeriane officinalis* pokazuju da se sedativni efekat može pripisati esencijalnom ulju i frakcijama valepotrijata (Wagner, 1980).

U istraživanju o djelovanju vodenog ekstrakta korijena valerijane na san uočena je poboljšana noćna motorna aktivnost u drugoj trećini noći i smanjena u zadnjoj trećini. Efekat je zavisao od doze. Nije bilo dokaza o promjenama u fazi mirovanja i EEG spektru. Pretpostavlja se da vodeni ekstrakt valerijane ispoljava blago hipnotičko djelovanje (Balderer i sar., 1985).

Valerijana dobro podnosi niske temperature, ali je vrlo osjetljiva na ostale klimatske elemente. Najbolje uspijeva u području sa prosječnim padavinama 800-1000 mm, sa srednjom godišnjom temperaturom 8-11°C. Pokazuje i veliku osjetljivost na nadmorsku visinu. Višegodišnja istraživanja pokazuju da valerijana povećava, odnosno smanjuje sadržaj etarskog ulja u korijenu u odnosu na stanište (povećanjem nadmorske visine povećava se i postotak etarskog ulja u biljci i obrnuto).

Biljka najbolje uspijeva na rastresitim, dubokim i humusnim zemljištima sa povoljnim vodnim i vazdušnim režimom, pri neutralnoj ili slabo kiseloj pH vrijednosti. Dvogodišnja kultura služi samo za dobijanje sjemena. Najpovoljniji predusjev za valerijanu su jednogodišnje leguminoze (soja, grašak, grahorice i dr.), kao i žitarice, te vrste koje rano napuštaju zemljište. Valerijana se ne bi trebala saditi poslije kultura za čiju zaštitu su korišteni herbicidi na bazi atrazina ili linurona. Prinos suhog korijena valerijane sa jednog hektara je veoma različit i kreće se u intervalu 1500-3000 kg/ha suhog korijena.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Ogljed u uslovima fotoperioda

Istraživanja su provedena na lokaciji Donja Koprivna, grad Cazin, 2016. i 2017. godine. Ogljed je dizajniran tako da su odabrane biljke tretirane teškim metalima, kadmijem i cinkom, kao i melatoninom kao pretretmanom. Koncentracije kojima su biljke izložene određene su prema Pravilniku o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani (Službeni glasnik BiH, br.: 37/09 i 39/12). Korišteni su tretmani zemljišta prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Tretmani zemljišta i njihove oznake

Oznaka tretmana	Tretman	Koncentracija (mg/L)
1	Kontrola	-
2	Cd (rastvor CdSO ₄)	15
3	Zn (rastvor ZnSO ₄)	3000
4	Melatonin 0,1 mM	23,23
5	Melatonin + Cd	23,23 i 15
6	Melatonin + Zn	23,23 i 3000

Ogledi su postavljeni u poljskim uslovima po split-plot metodi u tri ponavljanja (tabela 5). Split-plot je najčešće primjenjiva metoda dizajniranja ogljeda u poljoprivrednim, ali i ostalim disciplinama, u slučajevima kada se nezavisne varijable teško mijenjaju u eksperimentu i potpuno slučajni dizajn nije moguć. Veličina parcele je iznosila 15 m², a veličina parcelica bila je 1,5 m². Ukupan broj biljaka po parcelici je 15.

Tabela 5. Split-plot blok parcele

Ponavljanja						
a	3	4	5	6	1	2
b	2	3	4	5	6	1
c	1	2	3	4	5	6

Tabela 6. Fizičko-hemijska svojstva zemljišta i metode njihovog određivanja

Fizičko-hemijska svojstva	Mjerna jedinica	Metoda određivanja
Teksturna klasa zemljišta	-	ISSS, Baize 1993;
Aktivna i supstitucionna kiselost	pH u H ₂ O i 1M KCl	Potenciometrijska
Sadržaj CaCO ₃	%	Volumetrijska
Lakopristupačni fosfor i kalij	(mg/100g)	Al metoda Egner, Riehm-a
Humus	%	Metoda Kotcman
Cd i Zn	mg	Digestija sa HNO ₃ i H ₂ O ₂ , AAS

Prije sadnje u laboratoriji Poljoprivrednog zavoda u Bihaću izvršene su analize zemljišta u cilju utvrđivanja fizičko-hemijskih svojstava, po metodama prikazanim u tabeli 6. Dobivene vrijednosti predstavljene su u poglavlju rezultata i diskusije ovog rada.

4.2. Priprema zemljišta

Pripremi zemljišta za sadnju matičnjaka i valerijane posvećena je posebna pažnja u smislu vremena obrade i dubine oranja i suzbijanju korovskih biljaka, što je od posebnog značaja ako se zna da ove ljekovite biljke na istom mjestu ostaju 5-6 godina, a nekada i duže. S obzirom da na odabranoj parceli nije bilo predusjeva, priprema zemljišta je započela krajem ljeta, oranjem parcele na potrebnu dubinu. Cilj pripreme zemljišta je da se stvori što dublji i rastresitiji sloj oranice. Polje je orano na dubinu oko 30 cm i ostavljeno u otvorenim brazdama da prezimi. Na parceli nije vršeno đubrenje stajnjakom, ni mineralnim đubrivima.

4.3. Gajenje biljaka

Uzorci biljnog materijala u sklopu ovog rada pripadaju dvjema sortama Lamiaceae, vrsta *Melissa officinalis* i Caprifoliaceae, vrsta *Valeriana officinalis*. Biljke su odabrane na osnovu anegdotalnih dokaza o djelotvornosti u liječenju neuroloških poremećaja i pregleda na prisustvo indolamin neurohormona.

Sjeme matičnjaka je posijano u posude za naklijavanje, prekriveno samo tankim slojem sitne zemlje i redovno zalijevano:

1. vodom i
2. vodenim rastvorom melatonina, koncentracije 100 μ M.

Sijanje sjemena izvršeno je u rano proljeće (sredinom marta) i držano na temperaturi od $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Sjeme je počelo sa nicanjem za 20-25 dana od sijanja, kad su biljke dobile 4-6 para listova i dostigle visinu od 2 cm. Poslije toga, rasad je vađen i rasađivan na stalno mjesto u odabranoj parceli. Podizanje zasada matičnjaka obavljeno je sredinom aprila. Sađen je na rastojanju od 50 cm između parcelica i 30 cm između biljaka. Sađenje je vršeno ručno.

Pri gajenju matičnjaka primijenjena je agrotehnička mjera okopavanja bez prihranjivanja mineralnim đubrivima. Prema stepenu zakorovljenosti parcele, kako nije bilo predusjeva okopavano je 3 puta godišnje. Prvo okopavanje obavljeno je čim se pojavio prvi korov nakon sadnje mladih biljčica, pazeći da se iste ne povrijede. Drugo okopavanje je izvršeno 30 dana poslije prvog, a zadnje neposredno pred berbu, kako bi se osiguralo da dobijeni uzorci budu bez korova.

Za razliku od matičnjaka, rasad valerijane dobiven je u sadnicama od mjesnog sakupljača ljekovitog bilja. Jedan dio sadnica je držan u vodi, a drugi u rastvoru melatonina koncentracije 100 μM , 48 h, u tamnom, nakon čega su biljke sađene na stalno mjesto u odabranoj parceli. Podizanje zasada valerijane je obavljeno krajem aprila. Sađen je na rastojanju 50 cm između parcelica i 30 cm između biljaka. Prilikom sađenja vođeno je računa da se zemljište što bolje priljubi uz korijen rasada, kako bi se povećao postotak primljenih biljaka. Primijenjena je ista agrotehnička mjera i režim kao kod gajenja matičnjaka, s tim da se okopavanje valerijane obavljalo do kraja juna. Na mjestima sa korovom, vršeno je plijevljenje, jer se u to vrijeme korijen valerijane intenzivno razvija i okopavanjem bi se mogao ozlijediti.

4.3.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje biljaka matičnjaka vršeno je po lijepom i suhom vremenu, prije cvjetanja. Uzorci lista uzeti su iz zadnjeg potpuno razvijenog lista stabljike, a uzorci korijenova su najprije dobro oprani vodom i posušeni papirom kako bi se uklonila površinska voda, te su usitnjeni za daljnju analizu (slika 13).



Slika 13. Uzorkovanje matičnjaka

Biljke valerijane su uzorkovane krajem oktobra i početkom novembra, u tehničkoj zrelosti, koja nastupa kada u njihovom korijenu ima najveći postotak etarskog ulja. Korijen je vađen ručno. Korijenje je očišćeno od zemlje, odstranjeni su zeleni dijelovi i dobro oprano u hladnoj tekućoj vodi.

Svi uzorci su sušeni zamrzavanjem na temperaturi od -55°C , 25-30 h, u liofilizatoru (VaCo 2, ZIRBUS Technology, GmbH, Germany) u laboratorijama Biotehničkog fakulteta u Bihaću. Nakon liofilizacije uzorci su čuvani na 4°C do analize, ne duže od 90 dana.

4.3.2. Praćenje morfoloških karakteristika biljaka

Mjereni su sljedeći morfološki parametri:

1. visina biljaka,
2. promjer biljaka,
3. masa svježe biljke, korijena i stabljike,
4. masa suhe biljke, korijena i stabljike, te
5. razvijenost korijena.

Praćen je uticaj melatonina na pomenute morfološke karakteristike biljaka (slika 14). Također, određen je i sadržaj teških metala (Zn, Cd) u listu i korijenu biljaka kako bi se ustanovila distribucija istih kroz biljku, kao i njihov uticaj na konačni sadržaj melatonina.



Slika 14. Sušenje odabranih biljnih vrsta tradicionalnim putem

4.4. Hemikalije i reagensi

U tabeli 7 prikazane su korištene hemikalije i izvor nabavke istih.

Tabela 7. Hemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu rada

Proizvođač	Hemikalija
Sigma	<i>N</i> -Acetil-5-metoksitriptamin (melatonin standard) HPLC čistoće; 2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksihromen-4-one (kvercetin 3-beta-d-glukozid); 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH); natrij 1,2-naftokinon-4-sulfonat (Folin Ciocalteu reagens); 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ); 2-[2-[3,4-bis(2-hidroksietoksi)oksolan-2-il]-2-(2-hidroksietoksi)etoksi]etil dodecanoat (tween 20); Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)
Fisher Chemical	Metanol HPLC čistoće
Lach:ner	Etanol; metanol; voda HPLC čistoće; aceton; hlordna kiselina (HCl); nitratna kiselina (HNO ₃); vodonik-peroksid (H ₂ O ₂); sirćetna kiselina (CH ₃ COOH); natrij-hidroksid (NaOH); cink(II)-hidroksid (ZnSO ₄); kadmij(II)-hidroksid (CdSO ₄); natrij-karbonat (Na ₂ CO ₃)
Acros	3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina (galna kiselina); 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-carboksilna kiselina (trolox); Željezo(III)-hlorid (FeCl ₃); željezo(II)-sulfat-heptahidrat (FeSO ₄ ·7H ₂ O); Natrij-acetat (CH ₃ COONa· 3H ₂ O); Magnezij-karbonat (MgCO ₃); 1-etenilpirolidin-2-on (polivinilpirolidon, PVP)
Semikem	Bakar(II)-hlorid (CuCl ₂); amonijum-acetat (NH ₄ Ac); natrij-hidrogen-karbonat (NaH ₂ PO ₄); Bakar(II)-sulfat-pentahidrat (CuSO ₄ ·5H ₂ O); Dikalijum 2,3-dihidroksibutandioat (K-Na tartarat); 2,9-Dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin); 1-Deoksi-1-(3,4-dihidro-7,8-dimetil-2,4-dioksobenzo[g]pteridin-10(2H)-il)-D-ribose (Riboflavin)
Fisher	<i>N,N,N,N</i> -Tetrametiletilenediamin (TEMED); Nitro blue tetrazolium
Aldrich	4-hlor-1-naftol; 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin (ferozin)

4.5. Metode mjerenja, kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina

Mnoge instrumentalne metode za kvalifikaciju i kvantifikaciju melatonina izvorno su dizajnirane za primjenu na uzorcima poput krvnog seruma i plazme, pljuvačke i urina sisara. Nekoliko je pravih izazova u kvantifikaciji melatonina u biljkama:

- analiza je skoro uvijek destruktivna i
- biljke sadrže jedinjenja kao što su fenoli koji mogu ometati određivanje.

Stoga, od posebnog značaja u analizi biljnog materijala je priprema uzorka. Tečna ekstrakcija je uobičajen korak pripreme uzorka nakon primarne ekstrakcije iz biljnog materijala. Od otapala koriste se voda, puferi, metanol, dihloretan i dietileter (Dubbels i sar., 1995). Ekstrakcija na čvrstoj fazi se također koristi, pri kojoj se melatonin eluira pogodnim otapalom, kao što je metanol ili aceton (Chen i sar., 2003).

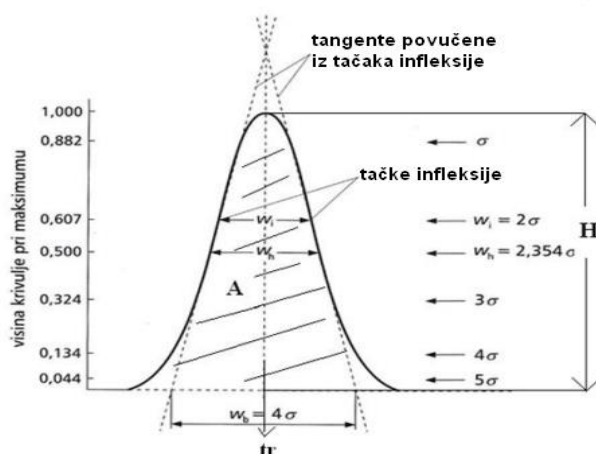
Imunotestovi (enzimskogimuno-testa - ELISA i radioimunotesta - RIA) su ranije bile popularne metode zbog svoje specifičnosti i dostupnosti kitova (Poeggeler i sar., 1991; Dubbels i sar., 1995). Međutim, dobivene su smetnje sa melatonin specifičnim antitijelima, što zahtjeva validaciju imunotestova drugom analitičkom metodom (Van Tassel i O'Neil, 2001). Tekuća hromatografija visoke efikasnosti je uobičajena metoda za identifikaciju melatonina, zbog svoje sposobnosti daljnjeg razdvajanja spojeva mimo pripreme uzorka. HPLC tehnika se uglavnom koristi u kombinaciji sa elektrohemijskim, fluorescentnim i maseno-spektrometrijskim detektorima (Burkhardt i sar., 2001). Metode detekcije uključujući imunoafinitetnu hromatografiju, enzimski imunotest, kapilarnu elektroforezu su manje popularne metode za identifikaciju melatonina.

4.5.1. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Hromatografske metode služe za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje hemijskih sastojaka u složenim smjesama. Zajedničko svim hromatografskim metodama je postojanje nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Gasna ili tekuća pokretna faza nosi komponente uzorka kroz stacionarnu fazu, a odjeljivanje se bazira na razlikama u brzini kretanja komponenti kroz stacionarnu fazu. Nepokretna faza se odabire tako da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno, odnosno da različiti sastojci smjese budu različito dugo vezani, što uzrokuje razdvajanje smjese. Hromatografske tehnike nazive su dobile prema agregatnom stanju pokretne faze pa govorimo o gasnoj i tekućinskoj hromatografiji, te o fluidnoj hromatografiji u superkritičnim uvjetima.

Prema hromatografskom sastavu pri tekućinskoj hromatografiji moguća je upotreba normalnih i obrnutih faza. Hromatografija normalnih faza pretpostavlja da je nepokretna faza polarna (silikagel, te neutralni aluminijski oksid), a pokretna faza nepolarna (organska otapala). Odjeljivanje smjese spojeva ovisi o interakciji polarnog analita s polarnom nepokretnom fazom. Nepolarni spojevi bez polarnih funkcionalnih grupa slabo reagiraju s nepokretnom fazom. U hromatografiji obrnutih faza, pri kojoj je nepokretna faza nepolarna (modificirani silikagel), a pokretna faza polarna (smjesa vode i polarnog organskog otapala), mehanizam razdvajanja temelji se na hidrofobnosti analita.

Na odjeljivanje pri tekućinskoj hromatografiji utiče temperatura, posebno kada je riječ o rastvorima niskih koncentracija. Povišena temperatura poboljšava difuznost uzorka i reducira viskoznost pokretne faze, pa se time poboljšavaju kinetički parametri. S povišenjem temperature mijenja se i selektivnost kolone. Maksimalna dopuštena temperatura pri tekućinskoj hromatografiji je niža oko 20°C od temperature vrelišta pokretne faze. Sam proces rada zahtjeva unošenje malog volumena uzorka u tok mobilne faze pri čemu se, na osnovu specifičnih hemijskih i fizičkih interakcija, komponente smjese različito zadržavaju. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Retenciono vrijeme, odnosno vrijeme u kojem se tvar eluira (dođe do kraja kolone) je karakteristično za određenu tvar. Visoki pritisak povećava linearnu brzinu i daje komponentama manje vremena za zadržavanje, poboljšavajući tako rezoluciju hromatograma. Koriste se uobičajena otapala, čista ili u bilo kojoj kombinaciji.



Slika 15. Svojstva hromatografske krive

Hromatografska zona se širi proporcionalno dužini putovanja ili vremenu. Širenje površine zone pokazuje učinkovitost hromatografske separacije. Označuje se ili kao broj teoretskih

tavana n ili kao visina tavana H (Slika 15). Otpor prijenosu mase u obje faze, brzina protoka kroz nepokretnu fazu, uzdužna difuzija te nasumična sorpcija i desorpcija molekula tokom hromatografskog procesa su osnovni uzroci širenja hromatografske trake.

Kao detektori u HPLC tehnici koriste se detektori s nizom dioda (DAD), koji omogućuju snimanje cijelog spektra eluirane tvari u UV-Vis području (apsorbanca ovisi o vremenu zadržavanja i talasnoj dužini) fluorescentni detektor (FLD), UV-Vis detektor gdje se prate karakteristike otopljene tvari (apsorpcija u UV-Vis i infracrvenom području, fluorescencija ili struja na elektrodi), te sve više maseni spektrometri kao detektori (MS).

HPLC tehnika ima široko polje primjene, na koje se mogu dodati i analize mnogih termolabilnih i vrlo polarnih jedinjenja, ili jedinjenja visoke molekularne mase u farmaceutskoj, kliničkoj, biohemijskoj, forenzičkoj i industrijskoj praksi. HPLC tehnika ima mogućnost i vrlo preciznog djelovanja na selektivnost između jedinjenja kroz odgovarajući izbor kolona i sastava eluenta eksploatacijom interakcija između rastvora, mobilne i stacionarne faze (Rouessac i Rouessac, 2007). Nezaobilazna je primjena HPLC u ispitivanju zraka, hrane na prisustvo štetnih tvari (pesticida, polihloriranih bifenila, policikličnih aromatskih ugljikovodika). Izbor nepokretne faze ovisi o prirodi analita, prirodi ravnoteže koja se uspostavlja tokom procesa i vrsti interakcije koja nastaje između analita i hromatografske podloge. Kao nosač tekuće nepokretne faze najčešće je prisutan silikagel ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), a strukturno predstavlja nepravilnu prostornu rešetku SiO_4^- tetraedara. Na površini silikagela su siloksanske i silanolne grupe, te voda vezana vodikovom vezom na silanolne grupe. U modificiranim podlogama od silikagela ili sorbensima hidroksilne grupe silikagela su zamijenjene polarnim funkcionalnim grupama kao što su nitrilna ili diolna grupa, te nepolarnim lancima ugljikovodika, pri čemu svojstva nepokretne, modificirane faze ovise o vrsti i dužini vezanih lanaca ugljikovodika, pokrivenosti površine vezanom grupom, vrsti intermolekulskih interakcija organskog otapala i funkcionalnim grupama na površini adsorbensa.

Za svaki analit na koloni očitavaju se karakteristični parametri hromatografske krive. Kao kvalitativni parametri za pojedini analit prate se vrijeme zadržavanja, retenciono vrijeme, t_R i apsorpcijski spektri, a kao kvantitativni parametri površina i visina hromatografske krive te bazna širina. Jedna ili više mobilnih faza u HPLC metodi se pumpa kroz kolonu sa stacionarnom fazom. Analiti u uzorku ubrizgani u sistem zadržavaju se u skladu sa polaritetom, a hromatogrami se formiraju mjerenjem vremena u kojem su supstance eluirane iz kolone.

4.5.2. Ekstrakcija melatonina iz biljnog materijala (list i korijen, pojedinačno)

Dobra priprema uzorka je često ključ uspješnih analitičkih rezultata. Ima direktan uticaj na tačnost, preciznost i granicu kvantifikacije. Svrha pripreme uzorka je čišćenje istog prije analize i za analizu. U zadnje vrijeme je uložen znatan napor u razvoj metoda za prečišćavanje i kvantitativno određivanje sadržaja biljnih hormona u ekstraktima biljnog tkiva (Cohen i sar., 1986; Chen i sar., 1988). Male količine prisutnih hormona, njihova nestabilnost, kao i komplikovan proces prečišćavanja od neželjenih jedinjenja, predstavljaju najveću prepreku u stvaranju pouzdane metode određivanja.

Za ekstrakciju je odabrana metoda direktne ekstrakcije, koja se u dosadašnjim istraživanjima melatonina pokazala najboljom uz metanol kao ekstrakciono sredstvo. Svi procesi u pripremi uzoraka su vršeni pod tamnim vještačkim svjetlom, zbog mogućeg uticaja svjetla na raspad analita (Arnao i Hernandez-Ruiz, 2009a).

Za mjerenje fitomelatonina izvagano je 0,1-1 g zamrzavanjem osušenog uzorka biljnog materijala (list i korijen) i stavljeno u testne tube sa metanolom u ukupnom volumenu od 10 mL. Takvi uzorci ostavljeni su preko noći (15-17 h) na 4°C u mraku i uz tresenje, nakon čega je izvršen ultrazvučni tretman na ultrazvučnoj kupelji (WiseClean WUC, witeg GmbH, Germany) u trajanju od 30 minuta na 4°C u smjesi vode i leda. Tube sa biljnim tkivima centrifugirane su na 6000 rpm, 30 minuta (Alresa Mod. DIGICEN). Supernatant je prenešen u drugu bočicu, a preostali biljni ostatak je dodatno tri puta ispran sa 0,5 mL metanola. Ekstrakt svakog uzorka je isparen do suha pod vakumom (Rotavapor R-215, Buchi Switzerland). Ostatak je ponovo otopljen u 1 mL metanola, prenešen u vialu i čuvan na 4°C do analize. Pred analizu uzorci su filtrirani, te analizirani visokotlačnom hromatografijom povezanom DAD i FLD detektorom. Svi ekstrakti su čuvani u tamnim bocama, zaštićeni od svjetlosti, na 4°C. Da bi se procijenio stepen ekstrakcije melatonina iz biljnog materijala, nekim uzorcima je dodano 100 µL internog standarda koji sadrži 100 µg melatonina, koji su zatim podvrgnuti istim uslovima ekstrakcije.

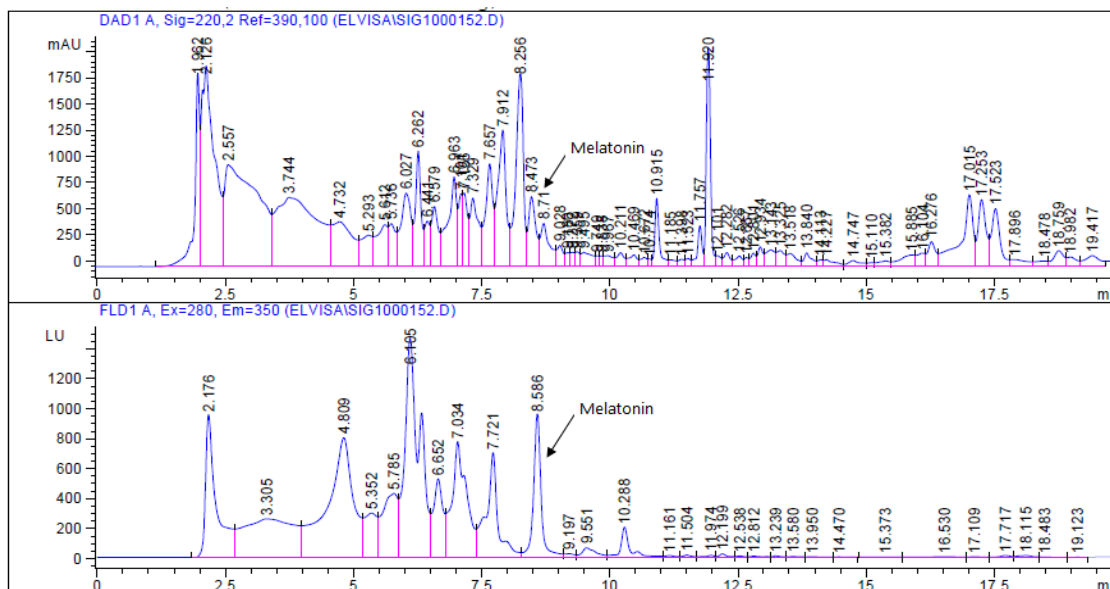
Neposredno prije HPLC analize, upareni ostatak uzorka je resuspendovan u 200 µL metanola, razblažen i prenesen u vialu. Melatonin je identifikovan i kvantifikovan na HPLC (Agilent 1100 Series liquid chromatograph, slika 16) uz reverznu fazu C₁₈ Gravity kolonu (Nucleodur, 3 µm promjer čestice, 150x4 mm, Macherey Nagel, Germany) sa integriranom pretkolonom i programiranu mobilnu fazu 20% metanol: 80% voda. Retenciono vrijeme melatonina

određeno je sa UV-Vis detektorom (*diode array detector*, DAD) na 222 nm i FLD detektorom. Talasna dužina je određena na osnovu UV spektra melatonina. Brzina protoka analita je 1,5 mL/min, pri sobnoj temperaturi (25°C).

Za kvantitativnu analizu sintetički melatonin je otopljen u smjesi vode i metanola (1:1), 0,0200 g melatonina u 100 mL metanola, a daljnja razrijeđenja su pripremljena neposredno prije upotrebe. Kalibraciona kriva melatonina napravljena je sa HPLC-FLD i HPLC-DAD u opsegu koncentracija od 0,5 do 200 µg/mL. Koncentracija melatonina određena je na osnovu područja HPLC pikova (slika 17). Koeficijent emisije je 350, a ekscitacije 280.



Slika 16. Tečni hromatograf visokih performansi HPLC



Slika 17. Izgled DAD i FLD hromatograma sa razdvojenim pikovima melatonina iz uzoraka

4.6. Određivanje sadržaja teških metala atomskom apsorpcionom spektrofotometrijskom analizom (AAS)

Atomska apsorpciona spektrometrija (AAS) je tehnika mjerenja količine hemijskih elemenata prisutnih u uzorcima mjerenjem apsorbiranog zračenja od strane ciljanog hemijskog elementa, što se postiže očitanjem spektra nastalog pobuđivanjem uzorka zračenjem. Atomi apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo svjetlo i prelaze u viši nivo energije. Metode atomske apsorpcije mjere količinu energije u obliku fotona svjetlosti koje apsorbuje uzorak. Detektor mjeri talasne dužine svjetlosti koje prenosi uzorak, i uspoređuje ih sa talasnim dužinama koje su prvobitno prošle kroz uzorak. Zatim, procesor signala integrira promjene apsorbirane talasne dužine, koje se pojavljuju u spektru kao vrhovi apsorpcije energije u diskretnim talasnim dužinama. Energija neophodna da bi elektron napustio atom je poznata kao energija jonizacije i specifična je za svaki hemijski element. Kada se elektron kreće iz jednog energetskog nivoa u drugi unutar atoma, emituje se foton sa energijom E. Atomi nekog elementa daju karakteristične spektralne linije. Svaki atom ima svoj poseban obrazac talasnih dužina u kojima će apsorbirati energiju, zbog jedinstvene konfiguracije elektrona u vanjskoj ljusci. To omogućuje kvalitativnu analizu uzorka. Koncentracija se izračunava na osnovu Lambert-Beerovog zakona, koji glasi:

$$I_p = I_0 \cdot 10^{-k \cdot b \cdot N_0}$$

gdje je:

I_0 – početni intenzitet zračenja,

I_p – intenzitet zračenja nakon prolaska kroz atomsku paru,

N_0 – broj atoma u osnovnom nepobuđenom stanju,

b – dužina puta zračenja,

k – koeficijent apsorpcije.

Apsorbanca je direktno proporcionalna koncentraciji analita apsorbiranog za postojeći skup uslova. Koncentracija se obično određuje iz kalibracione krive, dobijene primjenom standarda poznate koncentracije. Međutim, direktna primjena Lambert-Beerovog zakona u AAS je teško zbog: varijacija u efikasnosti atomizacije iz matrice uzorka, neuniformnosti koncentracije i dužine puta atoma analita. Primijenjene hemijske metode se zasnivaju na pitanju interakcija, odnosno, hemijskih reakcija. U analitičkoj hemiji, AAS je tehnika koja se uglavnom koristi za određivanje koncentracija određenog elementa metala u uzorku i može se koristiti za analizu

koncentracija od preko 62 različita metala u rastvoru. Tehnika koristi plamen za atomizaciju uzorka, ali se koriste i drugi raspršivači kao što je grafitna peć. Tečni uzorak se u atomski gas pretvara u tri koraka:

1. desolvatacija – tečno otapalo se ispari, a ostaje suhi uzorak,
2. isparavanje - čvrsti uzorak isparava u gas i
3. isparavanja - jedinjenja koji čine uzorak se razbijaju u slobodne atome.

Za mjerenje koliko je datog elementa prisutno u uzorku, prvo se mora uspostaviti osnova za usporedbu koristeći poznate količine tog elementa u pripremi kalibracione krive (García i Báez, 2012).

U AAS je važna selektivnost, jer svaki element ima drugačiji set energetske nivoa i dovodi do vrlo uskih apsorpcijskih linija. Stoga je izbor monohromatora od vitalnog značaja u dobijanju linearne kalibracione krive, propusnost upijajućih vrsta mora biti šira od izvora svjetlosti, što je teško postići sa običnim monohromatorima. Monohromator se koristi za izbor specifične talasne dužine svjetlosti koju apsorbuje uzorak i u isključenju drugih talasnih dužina. Izbor specifične talasne dužine svjetlosti omogućava određivanje specifičnog elementa od interesa u prisustvu drugih elemenata. Svjetlo po izboru monohromatora je usmjereno na detektor, obično fotomultiplikatorsku cijev, čija je funkcija pretvoriti svjetlosni u električni signal proporcionalan intenzitetu svjetla.

Istraživanje metala u tragovima u mokrom i suhom taloženju povećalo se u posljednjih nekoliko desetljeća zbog njihovih negativnih ekoloških i posljedica po ljudsko zdravlje. Neki metali, kao što su Pb, Cd i Hg, akumuliraju se u biosferi i otrovni su za živi sistem. Antropogene aktivnosti su znatno povećale koncentracije metala u atmosferi (García i Báez, 2012).

4.6.1. Plamena atomska apsorpciona spektrometrija

Metode plamene atomske apsorpcije odnose se na direktno aspiracijsko određivanje. Obično završavaju kao analiza jednog elementa i relativno su bez spektralnih interferencija unutar elementa. Različiti plamen se može postići koristeći različite smjese gasova, u zavisnosti od željene temperature i brzine sagorijevanja. Neki elementi se mogu atomizirati samo na visokim temperaturama. Čak i na visokim temperaturama, ako je prisutan višak kisika, neki metali formiraju okside koji se ne redisociraju u atome. Da bi se smanjilo njihovo formiranje,

mogu se mijenjati uslovi plamena. U postupku mjerenja plamenom AAS mala količina ekstrahiranog uzorka ubrizgava se u plamen, gdje se joni reduciraju na elemente i isparavaju. Elementi prisutni u uzorku apsorbuju svjetlost na specifičnim talasnim dužinama u vidljivom ili ultraljubičastom dijelu spektra. Jedan od nedostataka ove metode je da u jednom vremenu može biti kvantificiran samo jedan element.

4.6.2. Grafitna ili elektrotermička AAS

Ova vrsta atomizatora predstavlja mini peć, a efikasnost atomizacije je oko 100%, što povećava osjetljivost i smanjuje granicu detekcije više od 100 puta. Postoje različite konstrukcije elektrotermičkih atomizatora i mogu biti u obliku cijevi, štapića, kivete, napravljene od grafita presvučenog pirolitičkim grafitom koji se zagrijava pomoću električne struje. Uzorak se ručno ili automatski postavlja u atomizator, gdje prvo isparava otapalo na temperaturi od 100°C nekoliko sekundi, a zatim se zagrijavanje nastavlja na 500-1400°C čime se razaraju organske supstance. Na kraju se uzorak brzo termički atomizira na visokoj temperaturi (do 3000°C). Plamenom tehnikom se određuju mg/L dok kod grafitne tehnike µg/L. Minerali i elementi u tragovima koji se određuju plamenom tehnikom su: Cu, Zn, Fe, Mn, Ca, Mg, Na, K, dok se Cu, Zn, Cd, Cr, Ni, Pb, Hg, As, Fe, Mn, Al, Co, Se, Mo određuju grafitnom tehnikom. Prednosti grafitnog atomizera ogledaju se većom efikasnošću i direktnim unosom malih količina uzoraka. Ostali analitički uslovi za oba teška metala dati su u tabeli 8, a analiza je određivana prema tabeli 9.

Tabela 8. Parametri u analizi teških metala

Parametri	Kadmij	Cink	Magnezij	Kalcij
Instrument	Atomski apsorpcioni spektrofotometar	Atomski apsorpcioni spektrofotometar	Atomski apsorpcioni spektrofotometar	Atomski apsorpcioni spektrofotometar
Model	PerkinElmer Aanalyst 800	PerkinElmer Aanalyst 800	PerkinElmer Aanalyst 800	PerkinElmer Aanalyst 400
Lampa	C-HCL	C-HCL	C-HCL	C-HCL
Struja lampe (mA)	4	15	6	15
Talasna dužina	228,80 nm	213,90	202,6	422,67
Gas	2:17 L/min (acetilen/zrak)	2:17 L/min (acetilen/zrak)	2:17 L/min (acetilen/zrak)	2,5:10 L/min (acetilen/zrak)
Otvor monohromatora	0.7H	0.7H	0.7H	0.6H

Sadržaj teških metala u pojedinim biljnim organima dvije biljne vrste su izvršene primjenom Perkin Elmer 5000 atomskog apsorpcionog spektrofotometra (slika 18). Standardni referentni materijal svih metala korišten je kako bi se izvršila kalibracija. Svi metali su određivani plamenom tehnikom u režimu apsorpcije, u modu integracije. Rađena su tri ponavljanja sa vremenom čitanja od 10 s po ponavljanju i vremenu odlaganja čitanja od 10 s sa brzinom unosa uzorka u raspršivač (eng. Nebulizer) između 5 i 10 mL/min. Kadmij i cink su atomizirani u oksidujućem svijetloplavom plamenu smjese komprimiranog zraka (17 L/min) i acetilena (2 L/min) kao goriva.

Tabela 9. Pregled teških metala i biljaka korištenih u istraživanju

Teški metal	Ispitivana biljna vrsta		
	Vrsta	Familija	Dio biljke
Kadmij (Cd²⁺)	<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	Korijen List
Cink (Zn²⁺)	<i>Valeriana officinalis</i> L.	Caprifoliaceae	Korijen List
Magnezij (Mg)	<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	Korijen
Kalcij (Ca)	<i>Valeriana officinalis</i> L.	Caprifoliaceae	List

Izračunavanje rezultata vršeno je korištenjem slijedeće formule:

$$C_m = \frac{C_u - C_{sp}}{100} \cdot \frac{1000}{m_u}$$

gdje je:

C_m – koncentracija metala u uzorku (mg/kg)

C_u – očitana koncentracija metala u uzorku (mg/L)

C_{sp} – očitana koncentracija metala u slijepoj probi (mg/L)

m_u – masa uzorka (g)



Slika 18. Perkin Elmer atomski apsorpcioni spektrofotometar i kalibraciona kriva

4.6.3. Priprema biljnog materijala mikrotalasnom digestijom (Wu i sar., 1997; Savić, 2008)

Predložene su brojne metode mokre digestije i suhog spaljivanja uzoraka u pripremi biljnog materijala za analizu elemenata. Metode suhog spaljivanja su relativno jednostavnije i sigurnije od metoda mokre digestije, ali se često javljaju pogreške zbog isparavanja, posebno za fosfor (P), kalij (K), sumpor (S), arsen (As), selen (Se) i živu (Hg). Osim toga, nerijetko je problematično suho spaljivanje sa pirolitičkim organskim materijalima jer mogu biti otporni na toplinsku razgradnju pri temperaturama od oko 550°C, koja se uobičajeno koristi za proces spaljivanja (Enders i Lehmann, 2012).

Od načina pripreme uzoraka, odnosno uspješnosti digestije čvrstih uzoraka ovisi tačnost kvantitativne spektroskopske analize (AAS, AES, ICP ili ICP/MS).

Digestija je mineralizacija čvrstog matriksa, pri čemu dolazi do degradacije i oksidacije organskih supstanci matriksa. Uzorci sa ultra niskim koncentracijama metala i koncentracijama u tragovima, sa visokim sadržajem organskih materijala i malom masom su dodatni izazov. Mokra digestija spada u konvencionalne metode digestije zasnovane na destrukciji organskih supstanci u gravimetrijskim pećima izlaganjem visokim temperaturama ili jakim kiselinama sa ili bez dodatka oksidacionog sredstva (Kebert, 2014).

Mikrotalasna peć je čvrsta i dizajnirana posebno za rad sa kiselinama. Šasija je napravljena od nehrđajućeg čelika otpornog na koroziju, a unutrašnja strana vrata obložena je sa 5 slojeva politetrafluoretilena (PTFE), odnosno Teflona, kako bi se spriječilo oštećenje od agresivnih kiselina korištenih za digestiju. Vrata su osmišljena na osnovu principa "pokretnog zida" koji se koristi u autoklavima visokog pritiska (Savić, 2008). Matične otopine za AAS pripremane su u kivetama u rotoru, osiguranim sa kalibrisanim momentnim ključem za izjednačavanje pritiska, kako bi se spriječilo curenje. Posude su dizajnirane da rade pod pritiskom do 10342135,94 Pa. Spaljuje se maksimalno osam uzoraka po analizi.

Većina bioloških uzoraka se potpuno digeruje koristeći smjesu HNO₃ i H₂O₂, osim ako ne sadrže visoke količine silikata. Međutim, mikrotalasna digestija uz HNO₃ i H₂O₂ ne obezbjeđuje uvijek potpuni prinos elemenata kao što su Fe, Al i Se. Matične otopine za AAS su pripremljene tako što se u kivete odmjerilo po 0,3 g liofiliziranog i sprašenog biljnog materijala, te je trbušastom pipetom dodano po 3 mL koncentrirane HNO₃, 3 mL H₂O₂ i 1 mL koncentrirane HCl. Kivete su zatvarane odgovarajućim poklopcem, stavljane u omotače, te

zaptivane prstenom i zaključavane imbus torzionim ključem momenta sile 10 Nm, kako bi se u svakoj kiveti uspostavio isti pritisak. Kivete zaštićene segmentima su postavljane u rotor peći za mikrotalasnu digestiju koja je podešena na temperaturni program prikazan u tabeli 10.

Tabela 10. Temperaturni program rada mikrotalasne peći

t (min)	T (°C)	E (W)
10	250	1500
15	250	1500
15	Ventilacija	

Svi uzorci su bili iste vrste i zapremine, kako bi protok mikrovala bio ravnomjeran kroz sve kivete. Primijenjena energija se može modifikovati u zavisnosti od broja uzoraka koji se istovremeno digeruju. Digerovani materijal iz ohlađenih kiveta je kvantitativno prenesen i profiltriran kroz plavi filter papir u normalni sud od 100 mL i dopunjen destilovanom vodom do crte.

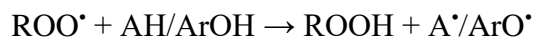
4.7. *In vitro* testovi mjerenja antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata

Istraživanja u području biljnih antioksidansa, posebno polifenola, veoma su raširena posljednjih godina. Iako je to intenzivno istraživano područje još uvijek nije preporučena standardna metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti (Frankel i Finley, 2008). Međunarodna organizacija AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) 2012. godine (AOAC, 2012) je preporučila ORAC metodu za mjerenje antioksidacijske aktivnosti u hrani kao standardnu metodu, ali se za istraživanja u biljnoj biologiji još uvijek koriste različite metode. Spektrofotometrijske i fluorimetrijske metode se uglavnom primjenjuju za mjerenje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata (Karadag i sar., 2009), ali u novije vrijeme sve se češće koriste i elektrohemijske metode (Piljac-Žegarac i sar., 2010; Barros i sar., 2011) te FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy Technique) spektroskopske tehnike (Lu i sar., 2011).

Postojeće metode koje određuju totalni antioksidantni kapacitet *in vitro*, najčešće prate samo jednu reakciju, što ih čini nedovoljno pouzdanim i jednodimenzionim za mjerenje aktivnosti multifunkcionalnih bioloških antioksidanata (Frankel i Meyer, 2000). Spektrofotometrijske metode za mjerenje antioksidativne aktivnosti prema mehanizmu djelovanja dijele se na:

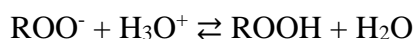
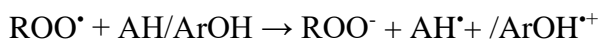
1. metode zasnovane na prijenosu jednog elektrona (eng. single electron transfer; SET),
2. metode zasnovane na prijenosu atoma vodika (eng. hydrogen atom transfer; HAT).

Metode bazirane na prijenosu atoma vodika mjere sposobnost antioksidansa prisutnog u biljnom ekstraktu da neutralizira negativno djelovanje slobodnog radikala donirajući atom vodika. Mehanizam se može pojednostavljeno prikazati na slijedeći način (Apak i sar., 2007):



gdje je ArO^\bullet ariloksilni radikal stabiliziran rezonancijom.

U metodama baziranim na prijenosu atoma vodika, i fluorescentne probe i antioksidansi reagiraju s ROO^\bullet , a antioksidativna aktivnost se određuje mjerenjem brzine gubitka fluorescencije sa i bez prisustva antioksidansa. Ove metode često nisu ovisne o otapalu i pH vrijednosti. Zbog praktičnosti i brzine često su korištene. Nešto sporije su metode bazirane na prijenosu elektrona zbog osjetljivosti na promjenu otapala i pH rastvora (Apak i sar., 2007). Mehanizam se šematski prikazuje:

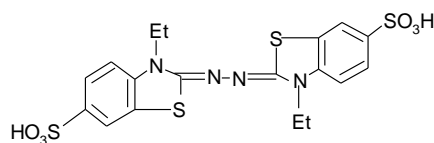


U većini ovih metoda antioksidans reagira s obojenom probom umjesto slobodnog radikala i izaziva promjenu boje, koja se može detektirati spektrofotometrom. Koncentracija antioksidansa u uzorku proporcionalna je intenzitetu promjene boje. Najraširenija metoda je FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) (Benze i Strain, 1996) gdje se mjeri redukcija žutog TPTZ-a (željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazin) u plavi produkt. Nadalje, kao varijanta FRAP metode koristi se i CUPRAC metoda (engl. Copper Reduction Assay), gdje se umjesto željeza koristi bakar (Prior i sar., 2005).

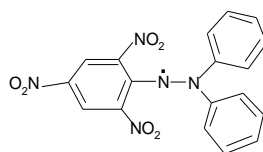
Postoje spektrofotometrijske metode koje uključuju i prijenos elektrona i prijenos atoma vodika. Najraširenije su: TEAC (engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), često nazivana i ABTS metoda, te DPPH (engl. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda (Prior i sar., 2005). Obje su zasnovane na sposobnosti antioksidansa da neutralizira djelovanje slobodnog radikala: $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (Slika 19a.) kod TEAC metode ili DPPH^\bullet (Slika 19b.) u DPPH metodi.

Reakciona smjesa uključuje antioksidans i oksidans, gdje usljed prijenosa jednog elektrona dolazi do redukcije oksidanta (Huang i sar., 2005).

a)



b)



Slika 19. Hemijska struktura: a) ABTS^{•+}, b) DPPH[•] radikala

Proba (oksidans) + e⁻ (antioksidans) → redukovana proba + oksidovani antioksidans
Promjena absorbance (ΔA) probe je u linearnoj zavisnosti sa koncentracijom antioksidansa. Nagib prave ove linearne zavisnosti odražava redukcionu kapacitet antioksidansa, koji se može izraziti troloks ekvivalentima (eng. trolox equivalents-TE) ili ekvivalentima galne kiseline (eng. gallic acid equivalents-GAE) (Benzie i Strain, 1999).

Spektrofotometrijske metode za mjerenje antioksidativne aktivnosti su i metode koje mjere količinu produkta oksidacije sa i bez prisustva testiranog ekstrakta. Takve metode su naprimjer metoda mjerenja zaštitne uloge od oštećenja proteina koja mjeri količinu nastalih karbonila (Mayo i sar., 2003).

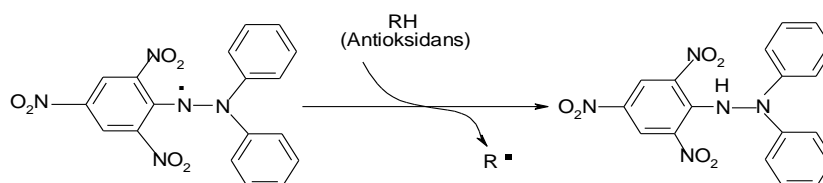
4.7.1. Priprema ekstrakata

Liofilizirani biljni materijal odmjeren je i maceriran u 30% V/V etanolu u odnosu 1:10, na sobnoj temperaturi uz mućkanje tokom 48 h. Ekstrakti su zatim procijeđeni na vakuumu, uz ispiranje ostatka na filtru ekstragensom, te zbog moguće degradacije termolabilnih komponenti upareni pod sniženim pritiskom na 40°C (Rotavapor R-215, Buchi, Switzerland).

Nakon 48 h sušenja u eksikatoru izmjerena je masa ostatka i izračunat prinos. Suhi ostatak je rekonstituisan u etanolu i razblažen do koncentracije od oko 50 mg/mL. Rastvori su čuvani na 4°C do analize. Dobiveni ekstrakti korišteni su u određivanju antioksidativne aktivnosti, ukupne sposobnosti redukcije ekstrakata određivane FRAP metodom, ukupnih fenola i flavonoida u listu i korijenu obje biljne vrste, te određivanja sposobnosti heliranja metala.

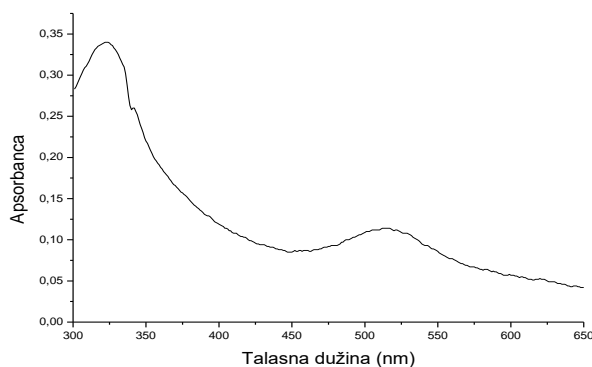
4.7.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (Soler-Rivas i sar., 2000)

U određivanju sposobnosti ekstrakata matičnjaka i valerijane da neutraliziraju slobodne radikale primijenjen je tzv. DPPH test (Soler-Rivas i sar., 2000) u kojoj antioksidans donira atom vodika ili elektron radikal, pri čemu se radikal reducira. Metoda je zasnovana na spektrofotometrijskom praćenju transformacije stabilnog, ljubičasto obojenog DPPH[•] radikala u redukovanu žuto obojenu formu DPPH-H. Promjena boje detektira se pri talasnoj dužini od 515 nm, koja predstavlja maksimum apsorpcije stabilnog DPPH[•] radikala. Nastalo jedinjenje ima manji intenzitet apsorpcije u vidljivom dijelu spektra, a broj sparenih elektrona je u stehiometrijskom odnosu sa obezbojenjem (slika 20).



Slika 20. Mehanizam reakcije DPPH[•] radikala (Brand-Williams i sar., 1995)

Osnovni rastvor DPPH reagensa (0,4 mM) napravljen je odmjeravanjem 0,0157 g čvrste supstance u odmjerni sud od 100 mL koji je dopunjen do crte 96% etanolom. Na dan mjerenja pravljen je radni rastvor dobijen miješanjem 22,5 mL osnovnog rastvora sa etanolom u sudu od 100 mL. Apsorbanca je bila približno oko 0,9. Radne probe su pravljene miješanjem 2 mL ekstrakta, 2 mL metanola, 1 mL 0,4 mM rastvora DPPH, dok se u drugu otpipetira 4 mL metanola i 1 mL 0,4 mM rastvora DPPH koja predstavlja kontrolni uzorak. Metanol je korišten za slijepu probu. Svi pripremljeni uzorci su poslije snažnog miješanja od 10 s ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi da se inkubiraju, nakon čega su apsorbance očitane na 515 nm na PhotoLab 6600 UV-VIS spektrofotometru (Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW) (slika 21).

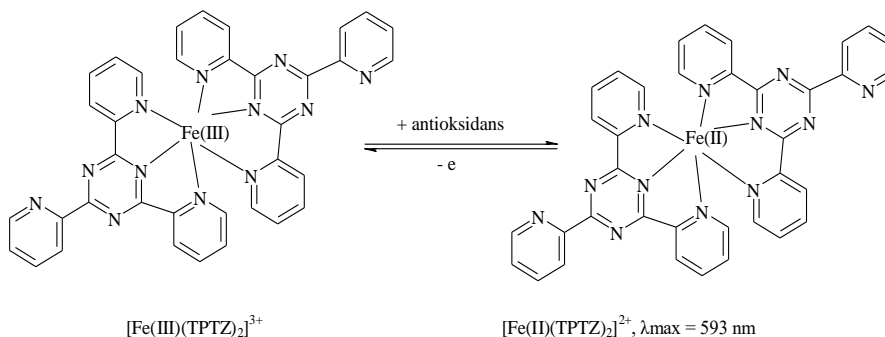


Slika 21. UV-Vis spektar nastalog kompleksa (maksimum apsorpcije na 515 nm)

Koncentracija ispitivanih uzoraka koje su uzrokovale inhibiciju 50% ukupno prisutnih DPPH radikala (EC_{50}) određene su linearnom interpolacijom iz odnosa učinka i koncentracije.

4.7.3. Određivanje sposobnosti redukcije ekstrakata FRAP testom (Ferric Reducing/Antioxidant Power) (Benzie i Strain, 1999)

Mehanizam FRAP metode bazira se na prijenosu elektrona, a kompleks željeza sa 2,4,6-tripiridil-s-triazinom, $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$ koristi se kao oksidans (slika 22).



Slika 22. Mehanizam djelovanja FRAP reakcije (Benzie i Strain, 1999)

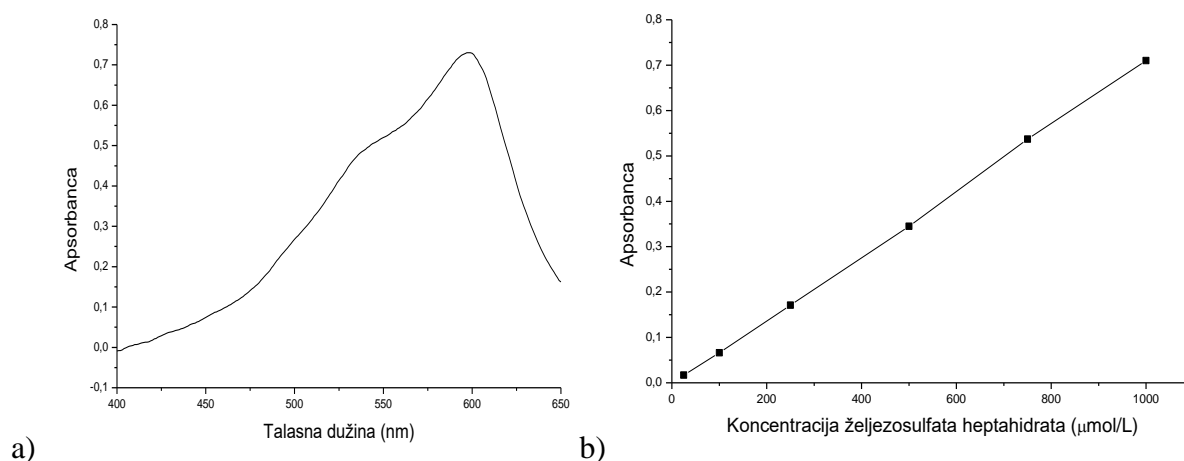
Redukcijom žuto obojenog kompleksa $Fe(III)$ -TPTZ u $Fe(II)$ u prisustvu antioksidansa i pri niskoj pH reakcijska smjesa mijenja boju u plavo sa maksimumom apsorpcije na 593 nm.

Reagensi:

- FRAP reagens = Acetatni pufer:TPTZ: $FeCl_3 \times 6H_2O$ = 10:1:1, (50 mL:5 mL:5 mL),
- Acetatni pufer, pH=3,6. U 100 mL destilirane vode rastvoreno je 0,31 g CH_3COONa i 1,6 mL koncentrirane CH_3COOH ,

- $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM dobije se rastvaranjem 0,0541 g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ u 10 mL destilirane vode, svjež rastvor,
- TPTZ rastvor 10 mM u 40 mM HCl dobijen je rastvaranjem 0,0312 g TPTZ u 10 mL 40 mM HCl (uvijek se priprema na dan određivanja),
- HCl 40 mM dobijena je razblaživanjem 0,068 mL koncentrirane HCl u 25 mL destilirane vode,
- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM dobijen rastvaranjem 0,2879 g u 100 mL destilirane vode.

Etanolni ekstrakti razrijeđeni su u omjeru 1:10. U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetirano je 240 μL destilirane vode, 80 μL uzoraka, te 2080 μL FRAP reagensa. Nakon intenzivnog miješanja, uzorci su 5 minuta inkubirani na 37°C. U slijepoj probi uzorak je zamijenjen 30% vodenim rastvorom etanola. Za izradu baždarne krive pripremljen je standardni rastvor $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u koncentracijama 0, 25, 100, 250, 500 i 750 μM (slika 23).



Slika 23. a) UV-Vis spektar nastalog kompleksa (maksimum apsorpcije na 593 nm) i b) kalibraciona kriva

Na osnovu dobivenih rezultata jednačina baždarne krive glasi:

$$y = 0,0007x - 0,0053$$

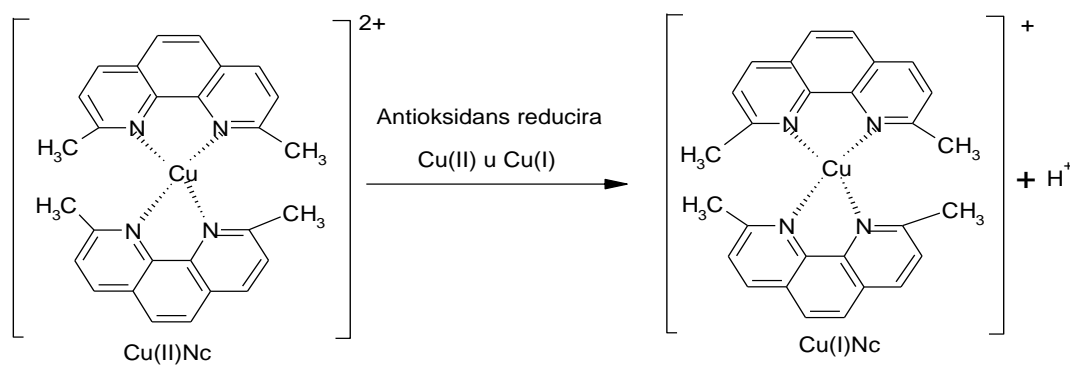
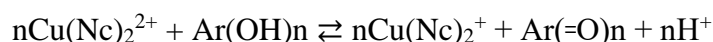
$$R^2 = 0,9997$$

gdje je: y – apsorbanca pri 593, x – koncentracija standardnog rastvora $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (mM),
 R^2 – koeficijent determinacije.

4.7.4. Određivanje sposobnosti redukcije Cu(II) jona (CUPRAC test) (Apak i sar., 2007)

CUPRAC metoda je prvobitno razvijena kao spektrofotometrijsko mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta, a kasnije proširena uz modifikacije. Odabrani hromogeni redoks reagens je lako dostupan, stabilan, selektivan i odgovara svim vrstama biološki važnih antioksidanasa (askorbinska kiselina, α -tokoferol, β -karoten, mokraćna kiselina i bilirubin), kao i sve vrste prehrambenih antioksidanasa (flavonoidi, prosti fenoli i hidroksicinaminske kiseline), bez obzira na hemijsku vrstu i hidrofilnost. Redoks reakcija je relativno brza, a rezultirajuća boja je stabilna tokom prihvatljivog perioda. Hromogeni reagens korišten ovom metodom je bis(neokuproin)bakar(II) helat, primjenjiv pri pH = 7 (slika 24). Apsorpcijski maksimum nastalog kompleksa pri reduciranju polifenola je 450 nm.

Princip metode se zasniva na redukciji neokuproina sa prisutnim antioksidansima, pri čemu se hidroksilne grupe polifenola oksiduju do odgovarajućeg hinona:



Svjetloplavi CUPRAC reagens

Narančastožuti produkt

Slika 24. Cuprak reakcija i hromofora: bis(neokuproin)bakar(I) helatni kation. Oslobođeni protoni u reakciji neutralizirani su NH_4Ac puferom (Ozyurek i sar., 2011)

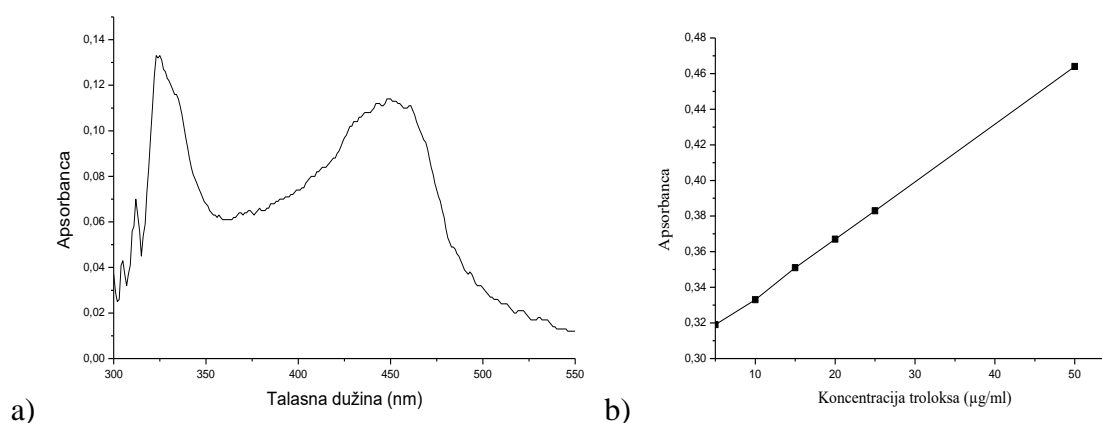
Iako je koncentracija Cu^{2+} jona u stehiometrijskom višku od neokuproina u CUPRAC reagensu za pomjeranje redoks reakcije udesno oksidans je $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ a ne samo Cu^{2+} , jer je standardni redoks potencijal $\text{Cu(II/I)neokuproin}$ kompleksa (0,6 V) znatno veći od samog $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ para (0,17 V). Kao rezultat, polifenoli se dosta brže i efikasnije oksidiraju sa Cu(II)-Nc nego sa Cu^{2+} (Ozyurek i sar., 2011). Općenito, miješa se vodeni CuCl_2 , amonijum-acetatni pufer (pH=7) i alkoholni rastvor neokuproina (Nc), uz pogodan alikvot nepoznatog antioksidativnog rastvora, te očitava apsorbanca na 450 nm, nakon 30 minuta u mraku.

Reagensi:

- CuCl_2 0,01 M, otopljeno je 0,2689 g anhidrovanog CuCl_2 u 200 mL destilirane vode,
- Acetatni pufer 1 mM, 19,27 g NH_4Ac otopljeno u 250 mL destilirane vode,
- Neokuproin 7,5 mM, otopljeno je 0,0781 g u 50 mL etanola.

Pripremljena je reakciona smjesa od 1 mL rastvora CuCl_2 (0,01 M), 1 mL acetatnog pufera (1mM), 1 mL etanolnog rastvora neokuproina ($7,5 \times 10^{-3}$ M) i 0,5 mL etanolnog ekstrakta i ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbance rastvora su spektrofotometrijski mjerene na 450 nm u odnosu na referentni rastvor koji je sadržao 1 mL rastvora CuCl_2 (0,01 M), 1 mL acetatnog pufera (1mM), 1 mL etanolnog rastvora neokuproina ($7,5 \times 10^{-3}$ M) i 1,1 mL dejonizovane vode. Za poređenje redukcionne sposobnosti ispitivanih jedinjenja korišten je nagib prave (slika 25).

Troloks je upotrebljen kao standardno jedinjenje, a redukcionni potencijal iskazan kao $\text{TEAC}_{\text{CUPRAC}}$ u mmol ekvivalenata troloksa g suhe tvari (mmol/L).



Slika 25. a) UV-Vis spektar nastalog kompleksa (maksimum apsorpcije na 450 nm) i b) kalibraciona kriva

Izračunavanje je vršeno prema formuli: $\text{TEAC}_{\text{CUPRAC}} (\text{mmol TE/L}) = C_{\text{T}}/C_{\text{S}} \times 1000$.

$$A = 0,0032 [T] + 0,302$$

$$R^2 = 0,9995$$

gdje je [T] koncentracija troloksa u $\mu\text{g/mL}$.

Svi eksperimenti su ponavljani tri puta, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost tri mjerenja \pm SD.

4.7.5. Određivanje sadržaja ukupnih fenola spektrofotometrijski reakcijom po Folin-Ciocalteu (TPC – Total Phenolic Content) (Singleton i sar., 1999)

Veliki broj aromatskog i začinskog bilja sadrži fenolne spojeve koji imaju izraženu antioksidacionu i antiradikalnu aktivnost. Zaštitna uloga fenolnih spojeva u biološkim sistemima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja elektrona slobodnog radikala, helatnog vezanja jona prijelaznih metala (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}), aktiviranja antioksidacionih enzima i inhibiranja oksidaza.

Metoda je zasnovana na oksidaciji molekula koje sadrže fenolne funkcionalne grupe. Tanini, flavonoidi i druge klase fenolnih jedinjenja, koji sadrže fenolne grupe i posjeduju sposobnost da redukuju alkalni rastvor fosfovolframolibdenske kiseline, učestvuju u ovoj reakciji.

Reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (FC reagens) razblažen sa destiliranom vodom = 1:10,
- rastvor Na_2CO_3 : 20 g anhidrida Na_2CO_3 u 100 mL destilovane vode = 20%,
- galna kiselina: 5,52 mg galne kiseline \times H_2O rastvoreno u destilovanoj vodi = 0,1 mg/mL.

U 300 μL razblaženog uzorka dodano je 1500 μL FC reagens. Nakon 6 minuta u mraku dodano je i 3750 μL 20% rastvora Na_2CO_3 . Sadržaj je intenzivno promiješan i ostavljen 2 h na tamnom. U slijepu probu, uzeta je destilovana voda umjesto uzorka. Osnovni standard galne kiseline dobijen je rastvaranjem 5,52 mg monohidratne galne kiseline (Mr 188,14 g/mol) u destiliranoj vodi do 50 mL. Za konstruisanje kalibracione krive korištene su koncentracije od 0, 10, 25, 50, 75 i 100 mg/L galne kiseline, u koju je dodat FC reagens i rastvor Na_2CO_3 . Na spektrofotometru su mjerene apsorbance na talasnoj dužini 740 nm. Na osnovu izmjerenih apsorbanci, sadržaj ukupnih fenola izražava se u broju mg ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe mase biljnog materijala (mgGAE/g). Na osnovu dobivenih rezultata jednačina baždarne krive glasi:

$$y = 0,0058x - 0,0079$$

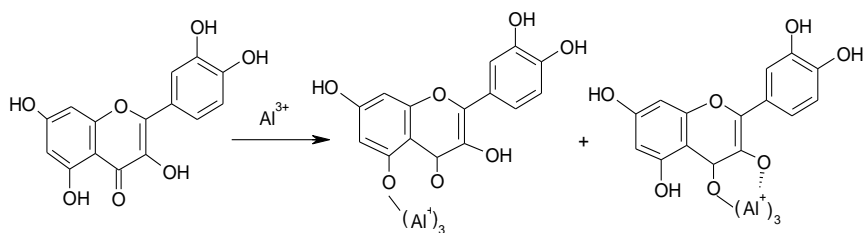
$$R^2 = 0,9999$$

gdje je: y – apsorbance pri 740 nm, x – koncentracija standardnog rastvora galne kiseline (mg/L), R^2 – koeficijent determinacije.

4.7.6. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (Chang i sar., 2002)

Metoda određivanja flavonoida bazira se na svojstvu flavonoida da u prisustvu jona metala (npr. AlCl_3) stvaraju metalokomplekse (slika 26), proširuju delokalizacije i pomjeraju UV i VIS apsorpcione trake za oko 50 nm prema višim talasnim dužinama (batochromni efekat), odnosno boja rastvora prelazi iz žute u žutozelenu, ili intenzivniju žutu, pri čemu je intenzitet obojenja proporcionalan količini prisutnih flavonoida. Flavonoidni fenolni spojevi se određuju iz etanolnog ekstrakta.

Flavonoli sa 3-OH i 5-OH (kemferol) i eventualnim 3', 4'-OH (kvercetin, rutin, kvercitrin, miricetin) imaju apsorpcioni maksimum u intervalu 415 – 440 nm. Na 415 nm flavonoli daju najjači signal, a flavoni slabiji. Izgled apsorpcionog spektra i stabilnost kompleksa zavisi od pH vrijednosti. Optimalna pH vrijednost za građenje kompleksa je oko 6. U vrlo kiseloj sredini, kompleks se ne gradi (udio deprotonovanog oblika flavonoida je zanemariv), pri $3 < \text{pH} < 6$ gradi se ljubičasti kompleks, pri $6 < \text{pH} < 8,5$ gradi se plavi kompleks, ali je rastvorljivost Al-soli mala zbog hidrolize, dok iznad pH 8,5, sistem nije stabilan.



Slika 26. Reakcija helatizacije Al^{3+} sa kvercetinom

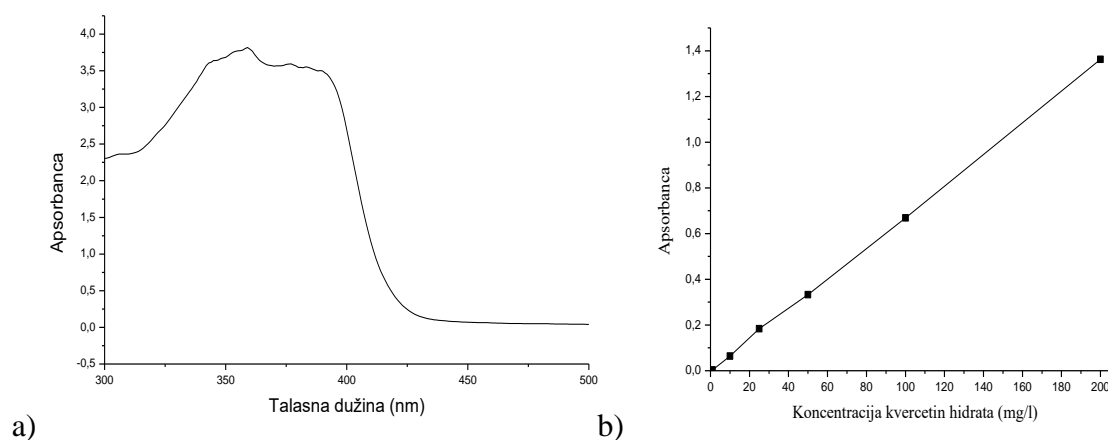
Reagensi:

- CH_3COONa 1 M (6,736 g $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ u 50 mL destilirane vode),
- AlCl_3 0,75 M (5,00025 g AlCl_3 rastvoreno u 50 mL destilirane vode),
- Kvercetin 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (20 mg kvercetina rastvoreno u 100 mL 70% etanola).

U 20 μL uzorka dodano je 880 μL destilirane vode. Reakcija započinje dodavanjem 60 μL natrijevog nitrata, a nakon 5 minuta i 60 μL AlCl_3 . Nakon 6 minuta dodano je 400 μL rastvora natrijevog hidroksida, te je smjesa dopunjena destiliranom vodom do 2 mL. Apsorbanca je mjerena na 415 nm prema slijepoj probi.

Standardna kriva je konstruisana kao zavisnost apsorbanca i serije koncentracija rastvora kvercetina (0,500–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (slika 27). Iz kalibracione krive izračunat je sadržaj flavonoida

u ispitivanim ekstraktima i izražen u mg ekvivalenta kvercetina (QE) po gramu suhog biljnog materijala.



Slika 27. a) UV-Vis spektar standardnog rastvora kvercetin hidrata i b) kalibraciona kriva

Na osnovu dobivenih rezultata jednačina kalibracione krive glasi:

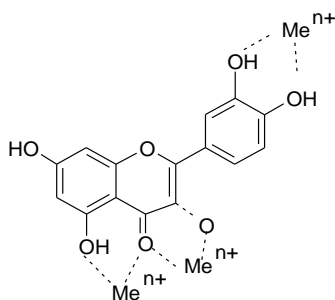
$$y = 0,006x - 0,001$$

$$R^2 = 0,9999$$

gdje je: y – apsorbanca pri 415 nm, x – koncentracija standardnog rastvora kvercetin hidrata (mg/L), R^2 – koeficijent determinacije.

4.8. Određivanje sposobnost biljnih ekstrakata da heliraju metale (Dinis i sar., 1994)

Metalni joni željeza (Fe^{2+}) i bakra (Cu^{2+}) mogu katalizirati stvaranje slobodnih radikala. U živim organizmima oni su vezani za proteine, što im ograničava učešće u reakcijama koje daju radikale i imaju esencijalnu fiziološku funkciju u živim ćelijama. Flavonoidi imaju sposobnost helirati metalne ione što pridonosi njihovoj antioksidativnoj aktivnosti *in vitro*, ali nije poznato služe li kao učinkoviti helatori metala i *in vivo*. Stvaraju stabilan kompleks s metalima prijelazne grupe (Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) koji ovisi o prirodi same molekule (kateholnog dijela) i pH u kojem se nalazi. Heliranje se uglavnom odvija na hidroksilnim grupama na pozicijama 3' i 4' B prstena, poziciji 3 hidroksilne grupe A prstena, te na pozicijama 3 i 4 karbonilne grupe C prstena (Slika 28). Kad imaju nekoliko helirajućih mjesta, mogu se polimerizirati (npr. kopolimerizacija flavonoida i željeza odgovorna je za anemiju uočenu u osoba koje konzumiraju velike količine čajeva) (Irina i Mohamed, 2012).



Slika 28. Prikaz pozicija u molekuli flavonoida gdje se odvija heliranje metalnog jona (Me^{n+}).
(Irina i Mohamed, 2012)

Reagensi:

- FeSO_4 , 2 mM,
- Ferozin, 5 mM,
- EDTA.

Sposobnost heliranja Fe^{2+} jona od strane etanolnih ekstrakata valerijane i matičnjaka je određena metodom Dinisa i saradnika sa određenim modifikacijama (Dinis i sar., 1994). U 1 mL ekstrakta različite koncentracije obje biljne vrste (0,1, 0,5, i 1 mg/mL) dodano je 3,75 mL etanola i 0,05 mL rastvora FeSO_4 . Reakcija je pokrenuta sa 5 mM ferozinom (0,2 mL). Smjesa je energično promiješana i ostavljena da stoji na sobnoj temperaturi 10 min. Apsorbance su mjerene spektrofotometrijski na 562 nm. Smjesa etanola, ferozina i FeSO_4 bez uzorka korištena je kao kontrolni uzorak, a smjesa etanola i uzorka bez ferozina i FeSO_4 kao slijepa proba. Niža vrijednost apsorbance označava bolju aktivnost, odnosno željezo-jon helirajuću sposobnost analiziranog uzorka. Procenat helacionog djelovanja ekstrakata je izračunat pomoću sljedeće formule:

$$\% \text{ oksidacije} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100$$

gdje je A_0 je apsorbance kontrole, A_1 je apsorbance u prisustvu ekstrakta ili standardnog jedinjenja.

4.9. Određivanje sadržaja solubilnih proteina (Lowry i sar., 1951)

Metoda određivanja solubilnih proteina se bazira na reakciji Cu^{2+} sa peptidnim vezama proteina u baznom mediju. Reakcija vodi do redukcije Cu^{2+} u Cu^+ . U reakcionu smjesu se dodaje Folin-Ciocalteu reagens koji reagira sa Cu^+ -protein kompleksom kao i sa pobočnim

lancima Tyr, Trp i Cys pri čemu se prvobitno stvara nestabilan kompleks koji se zatim reducira. Na rezultate mjerenja značajno utiču:

- prisustvo agenasa koji zakiseljuju rastvor (npr. kiseline, jaki kiseli puferi, visoka koncentracija amonijum sulfata i sl.),
- prisustvo helirajućih agenasa koji vežu Cu^{2+} (npr. EDTA),
- prisustvo reducirajućih agenasa (merkaptoetanol, ditioneitol i sl.), te
- razlike u sadržaju Tyr i Trp u proteinima.

Za analizu proteina i enzimske aktivnosti korišteni su liofilizirani uzorci lista i korijena. Biljni materijal je usitnjen do praha pomoću tečnog azota i do ekstrakcije čuvan u zamrzivaču na temperaturi od -20°C . Za ekstrakciju je miješano 0,5 g uzorka i 4 mL ekstrakcionog pufera (w/v). Korišten je 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 6,4 sa 0,1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid) i 0,2% TWEEN (polioksietilen sorbitol monolaurat). Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10000 rpm pri 8°C . Odvojeno je 1 mL supernatanta i dodan 5% PVP (polivinilpirolidon), te je nakon miješanja na vorteksu vršeno ponovno centrifugiranje 10 minuta na 10000 rpm. Supernatant je korišten za analizu solubilnih proteina.

Reagensi:

- reagens 1 (2% rastvor Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH)
- reagens 2 (1% rastvor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- reagens 3 (2% rastvor K-Na tartarata)
- reagens C (reagens 1 + reagens 2 + reagens 3 = 98 mL + 1 mL + 1 mL)
- reagens 4 (Folin-Ciocalteu reagens razblažen destilovanom vodom u omjeru 1:3)
- standardni rastvor BSA (goveđi serum albumin) polazne koncentracije 1,0 mg/mL.

U epruvete je odmjereno 50 μL uzorka, 150 μL destilovane vode i 3 mL reagensa C. Nakon intenzivnog miješanja na vorteks miješalici i inkubacije od 15 minuta dodato je 0,6 mL reagensa 4 i homogenat ponovo promiješan i ostavljen da se inkubira u mraku 30 minuta. Za slijepu probu je umjesto uzorka primijenjen pufer za ekstrakciju (0,1 M Na fosfatni pufer). Apsorbanca je mjerena na 550 nm. Za konstruisanje standardne krive, koja predstavlja zavisnost apsorbance od koncentracije proteina, korišten je rastvor čistog proteina BSA, početne koncentracije 1,0 mg/mL.

4.10. Određivanje aktivnosti peroksidaza spektrofotometrijskom metodom

Određivanje aktivnosti peroksidaza spektrofotometrijskom metodom se zasniva na reakciji oksidacije pirogalola do purpurogalina od strane peroksidaze. Reakcija se odvija u prisustvu H₂O₂. Spektrofotometrijski se prati promjena apsorbance na 430 nm.

Reagensi:

- Na-fosfatni pufer 0,1 M, pH 6,4
- pirogalol 1 M (0,2522 g pirogalola otopljeno u 2 mL destilovane vode),
- H₂O₂ 1 M (227 μL 30% H₂O₂ razrijeđeno u 2 mL destilovane vode),
- biljni uzorak (solubilna proteinska frakcija).

U mjernu kivetu dodato je 50 μL uzorka, 30 μL 1 M pirogalola i Na-fosfatnog pufera do 3 mL. Reakcija je započeta dodavanjem 10 μL 1 M H₂O₂. Na talasnoj dužini od 430 nm praćena je promjena apsorbance u periodu od 180 sekundi. Aktivnost peroksidaza je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$A = \frac{\Delta A [\text{min}] \times R}{12 [\text{mMcm}^{-1}] \times c_{\text{proteina}}}$$

gdje je: ΔA [min] – promjena A₄₃₀ po minuti, R – razblaženje ($V_{\text{kivete}} / V_{\text{uzorka}}$), 12 mM / cm – ekstinkcioni koeficijent za purpurogalin, c – koncentracija proteina u mg/mL.

4.11. Nativna poliakrilamid gel elektroforeza (PAGE)

Nativna elektroforeza je tehnika razdvajanja makromolekula u nativnom obliku, odnosno nedenaturisanih makromolekula, u diskontinuiranoj sredini (*disc*-engl., discontinuous), zonalnom elektroforezom. Naelektrisane čestice se tehnikom zonalne elektroforeze kreću kroz inertni nosač, koji može biti filter papir, celuloza-acetat, skrobni gel, agar gel, poliakrilamid gel. Prednost ove tehnike je mogućnost stabilizacije, sušenja i hemijskog fiksiranja razdvojenih supstanci.

Za analizu aktivnosti superoksid dismutaze, svježi listovi matičnjaka i valerijane uzorkovani su 12h, te 15, 30 i 45 dana nakon tretmana teškim metalima, zamrznuti u tekućem dušiku 15 dana i skladišteni na -30°C do ekstrakcije. Ekstrakcija uzoraka je vršena prethodno opisanim postupkom za određivanje proteina i antioksidativnih enzima.

Pufer korišten za nativnu elektroforezu sadržavao je 0,025 M Tris i 0,192 M glicin (pH=8,3), uz intenzitet struje 120-160 V. Za razdvajanje SOD izoformi korišten je 8% gel za razdvajanje. Neposredno prije nanošenja na gel, 100 μ L uzorka pomiješano je sa 20 μ L pufera za uzorke koji je sadržavao 50 mM Tris (pH=6,8), 10% glicerol i 0,01% bromfenol plavo. Na gelove je stavljena količina uzorka koja odgovara 10 μ g proteina. SOD izoforme su određene nakon inkubacije gelova u rastvoru za specifično bojenje superoksid dismutaza (4 mg NBT (nitrobluetetrazolium), 1 mg riboflavina, 20 mL 0,1 M Tris pufera pH 7,8, 80 μ L 250 mM EDTA i 4 μ L TEMED). Po završetku inkubacije od 30 minuta, SOD izoforme su određene kao providne trake na ljubičasto obojenom gelu. ImageMAster TotalLab TL 120 software (Nonlinear Dynamics Ltd., Durham, USA) korišten je za određivanje retencionog faktora (Rf) i ukupne SOD aktivnosti, koja predstavlja sumu aktivnosti individualnih SOD izoformi.

4.12. Određivanje sadržaja pigmenta hloroplasta (Sairam i sar., 2004)

Osnovna uloga hloroplastnih pigmenata je apsorpcija svjetlosne energije koja se transformira u hemijsku energiju procesom fotosinteze. Boja pigmenta, kao i apsorpcija vidljivog dijela spektra, zavisi o prisustvu sistema konjugiranih dvostrukih veza u njihovim molekulama:



U fotosintetskom aparatu viših biljaka najznačajniji su hlorofili i karotenoidi. Dosada poznati hlorofili su -a, -b, -c, -d i -e, a više biljke sadrže hlorofil -a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) i hlorofil -b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) koji se nalaze u tilakoidima hloroplasta.

Hlorofili su esteri dikarbonske kiseline hlorofilina i alkohola fitola. Osnovna građevna jedinica je porfirinski prsten u čijem je središtu atom Mg vezan na N četiri pirolova prstena s dvije kovalentne i dvije koordinatne veze. Na porfirinsku jezgru vezan je fitolni rep bogat – CH_3 grupama. Karotenoidi (provitamini A) su narančastožuti pigmenti koji su po hemijskoj strukturi derivati izoprena (8 izoprenskih jedinica), a mogu biti aciklični, monociklični i biciklični. Najpoznatiji karoteni su β -karoten i likopen.

Reagensi:

- Aceton,
- $MgCO_3$.

Postupak ekstrakcije i određivanja pigmenata izveden je brzo, u mraku zbog fotosenzibilnosti pigmenata. Odvagan je uzorak lista mase 0,1 g i prenesen u tarionik. Na uzorak je dodano oko

pola žličice kvarenog pijeska, malo praha $MgCO_3$ radi neutralizacije kiselosti i 10 mL acetona. Nakon maceracije smjesa je kvantitativno prenesena acetonom na guč postavljen na epruvetu u vakuum boci. Nakon filtriranja uz ispiranje, filtrat je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 25 mL, koja je nadopunjena acetonom. Spektrofotometrom je očitana apsorbanca u dobivenom filtratu na 662, 644 i 440 nm uz aceton kao slijepu probu.

Dobivene vrijednosti apsorpcije (A_{662} , A_{644} i A_{440}) uvrštavaju se u Holm-Wetstteinove jednačine za izračunavanje koncentracije pigmentata u mg/L:

$$\text{hlorofil a} = 9,784 \times A_{662} - 0,990 \times A_{644} (\text{mg/dm}^3)$$

$$\text{hlorofil b} = 21,426 \times A_{644} - 4,65 \times A_{662} (\text{mg/dm}^3)$$

$$\text{hlorofil a + b} = 5,134 \times A_{662} + 20,436 \times A_{644} (\text{mg/dm}^3)$$

$$\text{karotenoidi} = 4,695 \times A_{440} - 0,268 \times (\text{hlorofil a + b}) (\text{mg/dm}^3)$$

Brojevi u jednačinama su molarni apsorpcijski koeficijenti po Holmu i Wetstteinu. Formula za izračunavanje koncentracije pigmentata na mg/g svježe tvari lista (SvT):

$$c = \frac{c_1 \times v \times r}{m}$$

gdje je:

c (mg/g) - masena koncentracija pigmenta izražena u miligramima po gramu svježe tvari lista

c_1 (mg/dm³) - masena koncentracija pigmenta izražena u miligramima po decimetru kubnom

v (mL) - volumen filtrata (tj. odmjerne tikvice) izražen u mililitrima = 25 mL

r - razrjeđenje filtrata

m (mg) – masa uzorka izražena u miligramima = 100 mg

4.13. Statistička obrada podataka

Rezultati su obrađeni koristeći program Origin Pro 8,5. Svi dobijeni podaci su statistički obrađeni pomoću softverskog paketa SPSS 24.0 statistical package (IBM, Somers, NY, USA). Razlike u srednjim vrijednostima između analiziranih faktora su upoređene Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$. Srednje vrijednosti u tabelama i grafikonima označene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju, dok se vrijednosti obilježene različitim slovom razlikuju za najmanju značajnu, softverski utvrđenu, razliku (eng. the least significant difference - LSD). Vrijednosti opadaju prateći alfabetni red.

Analiza glavnih komponenti (PCA - Principal Component Analysis) (Hotelling, 1936), provedena je na osnovu korelacijskih matrica. U navedenim matricama bile su uključene kvantitativne i kvalitativne osobine za sve kombinacije modaliteta oglednih faktora.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Fizičko-hemijska svojstva zemljišta

Fizičko-hemijske karakteristike zemljišta su određene standardnim metodama koje se koriste u Poljoprivrednom zavodu u Bihaću. Po teksturnom sastavu radi se o siromašnom, kiselom zemljištu. Prosječan sadržaj humusa je 2,30%, te je kao takvo okarakterisano kao slabo humozno. Odabrano zemljište ima nizak procenat karbonata, te lako pristupačnih makroelemenata kalija i fosfora u obliku K_2O i P_2O_5 (tabela 11).

Tabela 11. Pregled fizičko-hemijskih karakteristika ogledne parcele u uslovima fotoperioda

Dubina cm	pH		Humus %	$CaCO_3$ %	mg/100 g tla		Zn mg/kg	Cd mg/kg
	H_2O	M KCl			P_2O_5	K_2O		
0 - 30	6,54	5,56	2,30	1,10	2,20	19,45	96,08	0,41

Rezultati analize pokazuju da se radi o zemljištu sa slabo kiselom pH reakcijom, čiji pH u KCl-u iznosi 5,56. Ovakvo zemljište je pogodno za uzgoj većine ljekovitog bilja.

5.1.1. Meterološki uslovi tokom izvođenja ogleda

Za analizu toplotnih uslova korištene su prosječne vrijednosti srednjih mjesečnih temperatura zraka za vegetacioni period istraživanja. Variranja su bila izražena, posebno tokom jesenjeg perioda. Kako bi se sagledali osnovni pokazatelji vremenskih uslova, korišteni su meteorološki podaci iz Meteorološke stanice Bihać, koja se nalazi na udaljenosti od oglednih parcela oko 20 kilometara (tabele 12 i 13).

Tabela 12. Prosječne temperature (°C)

Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Σ
Temperatura (°C) 1961- 1990 god.	-0,3	2,2	6,4	10,9	15,5	18,9	20,7	19,9	16,5	11,6	6,5	1,6	10,9
Temperatura (°C) 2014.	6,4	6	9	12,3	14,9	19,5	20,5	19,8	15,5	13,5	9,7	4,8	12,6
Temperatura (°C) 2015.	4	1,2	7,1	11,6	17,3	20	23,8	22,1	17	10,6	7,7	4,1	12,2
Temperatura (°C) 2016.	3,6	7,9	7,1	13,3	15,5	20,2	22,9	19,6	16,9	10,5	8,5	0,6	12,2

Dinamika toplotnih uslova pokazala je da je u ovom području najhladniji mjesec januar, sa prosječnom vrijednošću 3,8°C (prosjek za 2015. i 2016. godinu). Slijedi mjesec februar sa prosječnom temperaturom 4,5°C. Tokom februara i marta temperatura zraka je rasla što je pozitivno uticalo na rast biljaka. U narednim mjesecima temperatura je takođe rasla i dostigla maksimum u julu mjesecu (22,9°C). U mjesecima koji su se karakterisali manjkom padavina temperature zraka su bile veće od prosjeka i to u aprilu za 2,4°C i u julu za 2,1°C u odnosu na višegodišnji prosjek (1961–1990. godine). U cjelini vegetacioni period matičnjaka i valerijane odlikovao se višim temperaturama zraka po mjesecima, a ukupne toplotne sume su uglavnom veće od višegodišnjeg prosjeka za Bihać i okolinu.

Tabela 13. Prosječne sume padavina (L/m²)

Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Σ
Padavine(L/m²) 1961-1990 god.	87	94	101	119	124	111	114	110	110	117	153	115	1355
Padavine(L/m²) 2014 god.	92	176	145	187	199	87	228	105	329	189	101	97	1934
Padavine(L/m²) 2015 god.	161	145	104	71	172	80	43,6	97	150	267	72	14	1378
Padavine(L/m²) 2016 god	100	216	148	74	165	118	104	128	117	166	186	2	1524

Analizirajući vodni režim ovog područja mogu se istaći dva kišna perioda. Prvi period je mjesec februar, te proljetni mjeseci mart i maj sa po približno 148 i 165 L/m² padavina. Drugi vlažni period je od oktobra do prve polovine novembra, kad prosječne mjesečne sume padavina iznose oko 170 L/m². Količine padavina u vegetacionom periodu bile su veće u odnosu na višegodišnji prosjek, i to za 32%. Raspored padavina je, isto tako bio povoljan jer je mjesec april bio umjereno sušan, a period najveće potrošnje vode je obilovao kišama (maj-juni). U periodu porasta stabla valerijane, kada se značajno povećava potrošnja vode, vodni režim je bio vrlo povoljan (maj sa 165 L/m², juni sa 118 L/m² i juli sa 104 L/m²). Treba istaći da su obilne padavine u septembru i oktobru nepovoljno uticale na uzorkovanje valerijane, dok je uzorkovanje matičnjaka odlikovalo povoljniji vodni režim.

5.2. Melatonin u biljnim vrstama *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L.

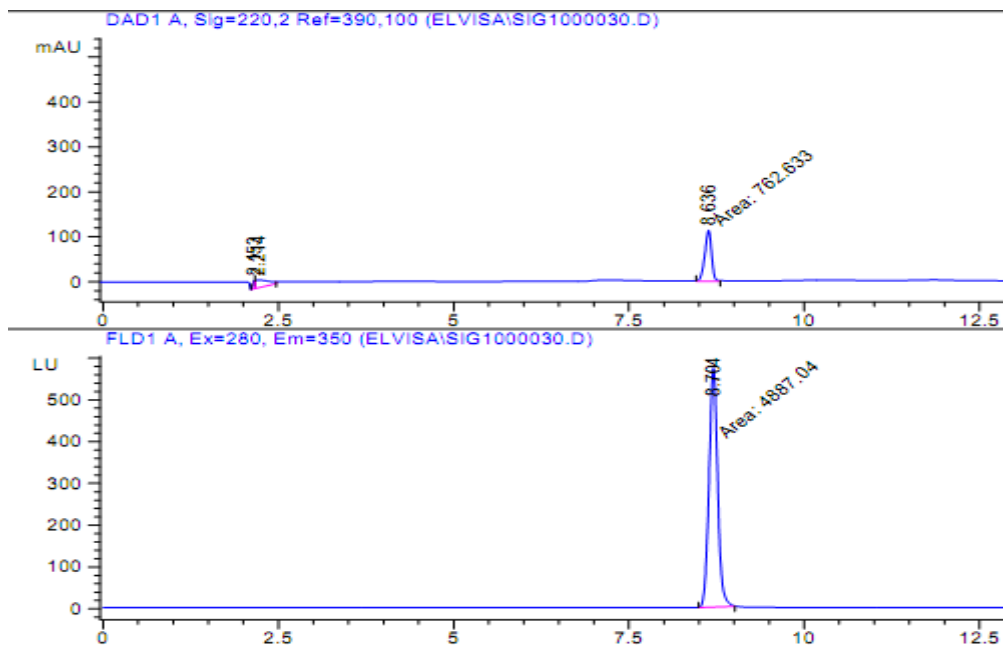
U postavljanju eksperimenta pri određivanju sadržaja melatonina u odabranim biljnim vrstama posebna pažnja je posvećena pripremi zemljišta i odabiru ogledne parcele. Pri tom,

odabrani su uslovi fotoperioda nad kontroliranim uslovima, zbog interesantnih istraživanja urađenih do sada. Naime, sadržaj melatonina (u različitim biljnim organima) lupine i paradajza raslih u uslovima fotoperioda je bio deset puta veći u odnosu na sadržaj melatonina istih biljaka raslih u kontroliranim komorama. Uticaj okolišnih faktora na količine melatonina prikazane su i u biljci zumbul (Tan i sar., 2007), kori bobica grožđa (Boccalandro i sar., 2011), te višnjama (Zhao i sar., 2012). Nadalje, nedavna istraživanja na riži pokazala su da je enzim triptofan dekarboksilaza pod uticajem temperature i svjetla. Nivo melatonina je bio viši pri 55°C i/ili pod tamnim uslovima i povezan je sa enzimatskom aktivnošću. Melatoninom obogaćena riža uzgajana pod uvjetima fotoperioda bila je snažnija i imala povećanu visinu i biomasu od biljaka koje nisu bile tretirane ovim hormonom. Neke fenotipske promjene u cvjetanju i prinosu zrna su također primijećene u ovim transgenim biljkama (Byeon i sar., 2014).

Pod terenskim uslovima kombiniraju se brojni faktori poput oscilacija u temperaturi, ciklusi dan/noć, UV zračenje i dostupnost vode. U takvim situacijama melatonin djeluje kao direktni antioksidans, te aktivira antioksidativni odgovor protiv stresnog okoliša (Arnao i Hernandez-Ruiz, 2014).

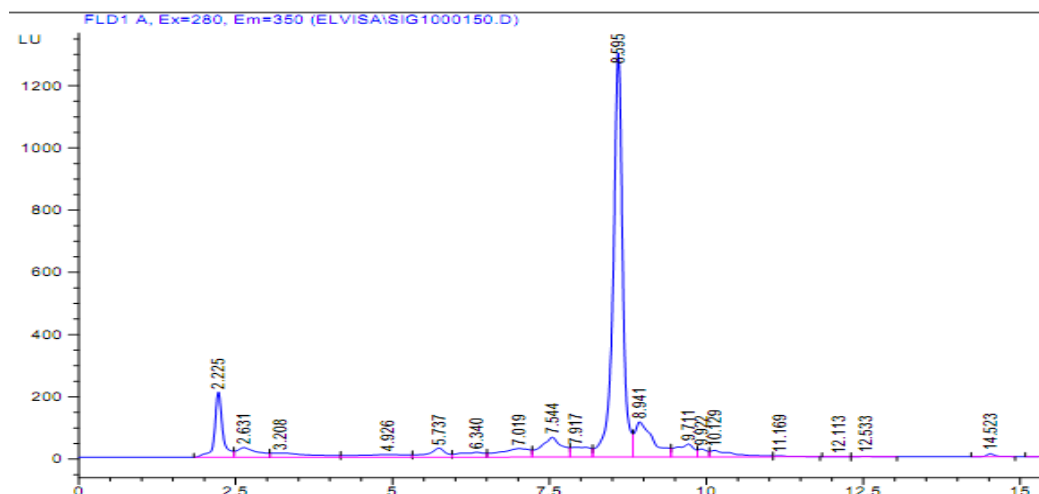
Sadržaj fitohormona (melatonina) u okviru ovog rada razmatran je sa tri aspekta. S jedne strane, praćen je uticaj koncentracije kadmija i cinka (0,015 i 3 g/L) u zemljištu, na sadržaj fitohormona u dvije ljekovite biljne vrste (valerijana i matičnjak) i njegova distribucija u listovima i korijenovima, kako bi se utvrdila varijabilnost u sadržaju biljnog hormona i razlika u biološkom odgovoru na abiotički stres izazvan djelovanjem pomenuta dva teška metala. S druge strane, proučavan je uticaj jona različitih metala (Zn^{2+} i Cd^{2+}) u koncentracijama koje odgovaraju njihovim maksimalnim dozvoljenim koncentracijama u zemljištu za dati metal, na sadržaj biljnog hormona. Konačno, određen je i eventualni uticaj povećanja sadržaja melatonina sa i bez prisustva pomenutih teških metala na morfološka svojstva analiziranih biljnih vrsta, sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, sposobnost neutralisanja slobodnih radikala, antioksidativnu aktivnost, sadržaj proteina, aktivnost nekih enzima, te heliranja metala.

Identifikacija i kvantifikacija melatonina po prvi puta je izvršena u biljkama *Melissa officinalis* L. i *Valerijana officinalis* L. primjenom tečne hromatografije visokih performansi povezane sa fluorescentnim i UV-Vis detektorom. Fluorescentni detektor je pokazao znatno veću osjetljivost pri analizi sadržaja melatonina, te su i rezultati izraženi istim. Tipični izgled hromatograma standarda melatonina prikazan je na slici 29.



Slika 29. Izgled DAD i FLD hromatograma standarda melatonina (3 ppm)

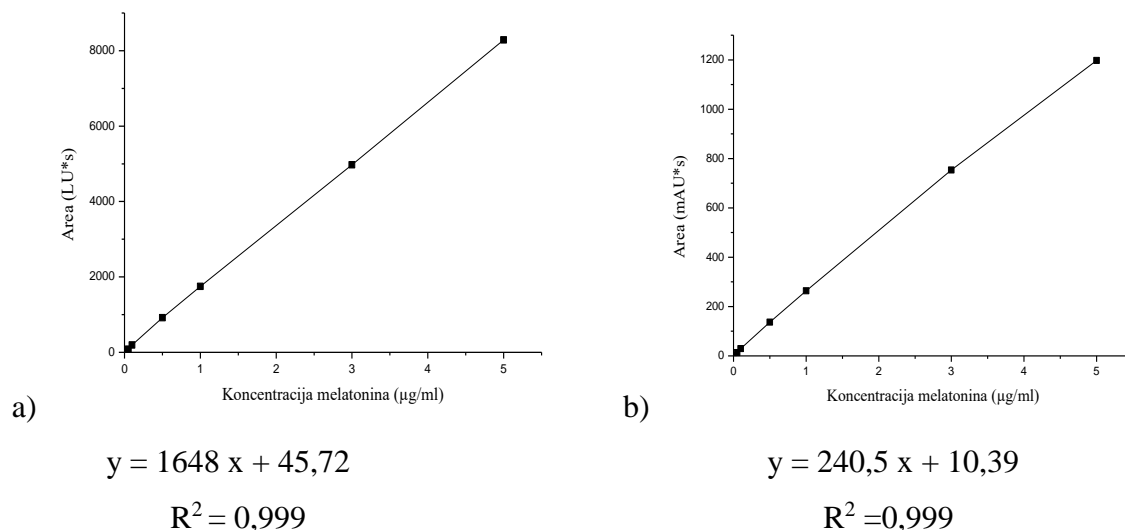
Identifikacija pikova i tačnost metode je potvrđena i u uzorcima sa dodanim komercijalnim melatoninom poznate koncentracije u toku ekstrakcije (slika 30) (Talebianpoor i sar., 2014). Rezultati se slažu sa ranijim istraživanjima Arnao i Hernandez-Riuza (2008) na drugim biljnim vrstama, gdje je nađeno da ultrazvučna tehnika može poboljšati ekstrakciju melatonina.



Slika 30. Izgled hromatograma sa razdvojenim pikovima melatonina iz uzoraka obogaćenih melatoninom prije procesa ekstrakcije

Linearnost metode utvrđena je serijom rastvora melatonina u opsegu koncentracija 0,1-5 $\mu\text{g/L}$. Rastvor iste koncentracije melatonina injektiran je tri puta, a srednja vrijednost tri mjerenja korištena je za konstruisanje standardne krive (slika 31). Dobijeni koeficijent

korelacije ($R^2=0,999$) pokazuje da je dobijena linearnost pogodna za kvantifikaciju melatonina. Određeni su koeficijent determinacije (LOD) i koeficijent kvantifikacije (LOQ) i iznosili su $0,100 \mu\text{g/mL}$ i $0,335 \mu\text{g/mL}$.



Slika 31. Standardna kriva melatonina HPLC povezanim sa a) fluorescentnim detektorom i b) DAD detektorom

Postoje različiti procesi u koje je melatonin uključen, izvan tradicionalnih uloga koje ovaj hormon ima kod sisara. Ponašanje melatonina je definisano na mnogo načina, a često se razlikuje u zavisnosti od polja istraživanja. Iz perspektive biljaka, uticaj melatonina na fiziološke procese se može posmatrati kao niz odgovora biljaka na borbu, izbjegavanje, ili poboljšanje stresne sredine (Erland i sar., 2017).

Istraživanja o ljekovitom bilju su pokazala da mnoge vrste imaju vrlo visoke koncentracije melatonina, neke i preko 1000 ng/g suhe mase (Badria, 2002; Chen i sar., 2003). Tipične fiziološke koncentracije u čovjeka su u rasponu $10 - 60 \text{ pg/mL}$ plazme (Chen i sar., 2003). Začinsko bilje može biti odličan prirodni izvor farmakoloških količina melatonina. Dok melatonin ima antioksidativni kapacitet i na fiziološkim i farmakološkim nivoima, farmakološki mogu biti efikasniji za liječenje bolesti (Reiter i sar., 2005b). U tabeli 14 prikazani su dobijeni rezultati endogenog melatonina u listu i korijenu dvije ispitivane biljne vrste nakon tretmana sa egzogenim melatoninom ($100 \mu\text{M}$) i teškim metalima.

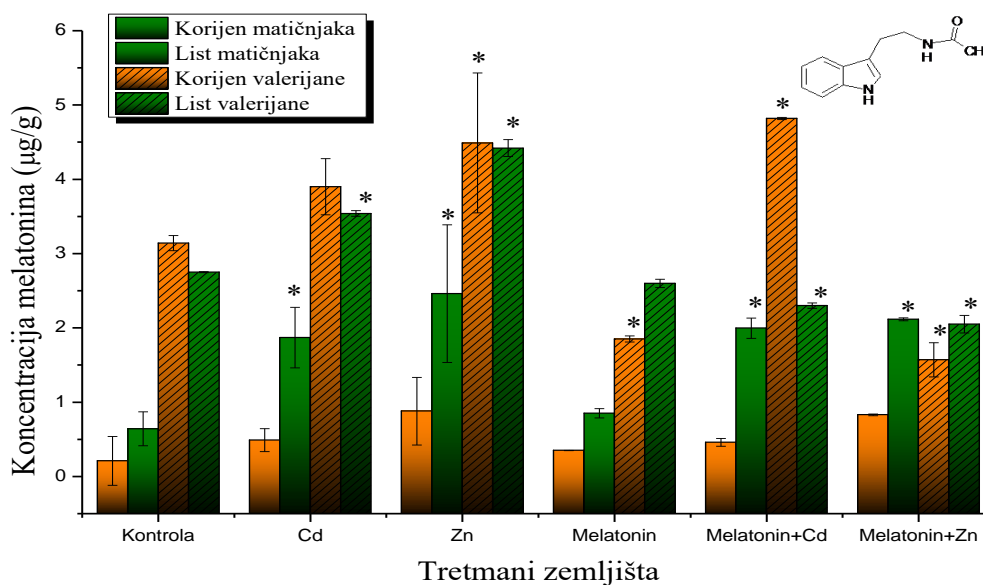
Tabela 14. Određena koncentracije melatonina primjenom HPLC-FLD tehnike ($\mu\text{g/g}$)

Tretmani zemljišta	Analizirani biljni organi			
	Korijen matičnjaka	List matičnjaka	Korijen valerijane	List valerijane
Kontrola	$0,21 \pm 0,329^a$	$0,64 \pm 0,132^a$	$3,14 \pm 0,102^a$	$2,75 \pm 0,006^c$
Cd	$0,49 \pm 0,154^a$	$1,87 \pm 0,235^{bc}$	$3,90 \pm 0,377^{ac}$	$3,54 \pm 0,039^d$
Zn	$0,88 \pm 0,455^a$	$2,46 \pm 0,535^c$	$4,49 \pm 0,941^{cd}$	$4,42 \pm 0,114^e$
Melatonin	$0,35 \pm 0,002^a$	$0,85 \pm 0,036^{ab}$	$1,85 \pm 0,041^b$	$2,60 \pm 0,056^{bc}$
Melatonin+Cd	$0,46 \pm 0,052^a$	$2,00 \pm 0,078^{bc}$	$4,82 \pm 0,015^d$	$2,30 \pm 0,037^{ab}$
Melatonin+Zn	$0,83 \pm 0,011^a$	$2,12 \pm 0,011^c$	$1,57 \pm 0,230^b$	$2,05 \pm 0,117^a$

* Vrijednosti označene istim slovom statistički se ne razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

U korijenu i listu matičnjaka došlo je do povećanja sadržaja melatonina pod uticajem povećane koncentracije oba teška metala, te još značajnijeg povećanja kod uzoraka tretiranih egzogenim melatoninom tokom rasta i razvoja, ali i u kombinaciji sa povećanim koncentracijama cinka i kadmija, u odnosu na kontrolu. Obje biljne vrste ne pokazuju povećan sadržaj melatonina kod biljaka tretiranih egzogenim melatoninom. Matičnjak je imao pozitivan trend rasta sadržaja melatonina i to za 40% povećanja u korijenu, te 25% povećanja u listu u odnosu na kontrolu. Valerijana, sa druge strane, po prikazanim rezultatima nema povećanje koncentracije melatonina eksternim dodavanjem istog. Sadržaj se smanjuje i to za 40% u korijenu, te za 5% u listu.

Jedan od mogućih razloga različite koncentracije melatonina u matičnjaku u poređenju sa valerijanom je različita inkubacija biljaka u ranom stadiju razvoja. Sjeme matičnjaka je tokom mjesec dana klijanja zalijeivano sa $100 \mu\text{mol/L}$ rastvorom melatonina, dok su mlade sadnice valerijane potopljene u isti rastvor tokom 48 h u mraku i nakon toga premještene na stalno mjesto u polju. Sjeme je razvojni stadij u životnom ciklusu biljke koja je vrlo zaštićen od djelovanja stresa iz okoline. Rast sadnica je osjetljiviji na djelovanje teških metala u odnosu na klijalo sjeme.



Slika 32. Histogram dobivenih koncentracija melatonina ispitivanih biljnih organa. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

Rezultati pokazuju da je list matičnjaka značajno bogatiji melatoninom u poređenju sa korijenom. Koncentracija je za čak tri puta veća, što je i očekivano budući da list matičnjaka pokazuje veću antioksidativnu aktivnost (Moradkhani i sar., 2010). Najveća koncentracija u korijenu i listu nađena je u biljkama tretiranim sa Zn ($0,881 \pm 0,788$ i $2,461 \pm 0,926$ µg/g), gdje je uočeno povećanje sadržaja melatonina za 75% i 73% u odnosu na kontrolu, te biljkama tretiranim melatoninom i Zn ($0,832$ i $2,115$ µg/g) sa povećanjem od 75% i 70% u odnosu na kontrolu.

Čini se da je cink, koji je inače neophodan u sintezi auksina (komponente koja regulira rast – indolsirćetna kiselina), i u ovom slučaju uticao na sintezu melatonina. Isto tako, cink je neophodan u sintezi triptofana kao prekursora u biosintezi indolsirćetne kiseline i melatonina. U skladu s tim je i promatrano povećanje u sadržaju triptofana kod zrna riže gnojene cinkom u vapneničkim zemljištima (Alloway, 2008).

Valerijana, kao biljka sa izuzetnim ljekovitim svojstvima bilježi dva do deset puta veće koncentracije melatonina od matičnjaka (korijen i list, pojedinačno). Ne može se reći da je korijen bogatiji ovim metabolitom u odnosu na list. Dobijeni rezultati pokazuju povećanu koncentraciju melatonina u korijenu biljaka tretiranih teškim metalima, sa i bez fitohormona. Najveći njegov sadržaj uočeno je u korijenu biljaka tretiranih sa jonima Zn, te sa melatoninom

i jonima Zn sa 4,491 $\mu\text{g/g}$, odnosno 4,879 $\mu\text{g/g}$ liofiliziranog biljnog materijala, što je za 30 i 35% veća koncentracija u odnosu na korijen kontrolnih biljaka (slika 32). Nije bilo značajnijeg povećanja u sadržaju melatonina u uzorcima tretiranim sa melatoninom prije sadnje. Mogući razlog dobijenih nižih koncentracija melatonina u valerijane mogao bi se pripisati lošim vremenskim uslovima prilikom uzorkovanja. Mjesec oktobar je 2016. godine okarakterisan kao mjesec sa velikim količinama padavina (tabela 12).

Biljni hormoni (auksini, giberelini i abscisinska kiselina) i opskrbljenost nutrijentima (ugljenim hidratima, azotom i dr.) igraju odlučujuću ulogu u komunikaciji između korijenova i izbojaka. Složene interakcije hormonalnih puteva i uticaj nutritivnih faktora na njih, još uvijek u potpunosti nije objašnjen.

Postoji dosta dokaza koji potvrđuju da joni teških metala imaju veliki uticaj na sadržaj jedinjenja sa hormonskom funkcijom. Tako, joni Zn u korijenu *Lupinus albus* L. izazvaju povećanje sadržaja endogenih količina melatonina, za oko 80 ng/g svježe mase, što je 12 puta veća količina u odnosu na kontrolu (Arnao i Hernandez-Ruiz, 2013). Pomenuta istraživanja su u skladu sa našim rezultatima.

Nekoliko skorijih naučnih radova navode i da joni Cd indukuju biosintezu melatonina u listovima riže od 6 ng/g svježe mase. Isti autori ukazuju da tretmani drugim biljnim hormonima, Pb^{2+} i herbicidima ne uzrokuju značajnije povećanje melatonina (Byeon i sar., 2015).

Nedavno je objavljeno da Cd regulira sadržaj melatonina u listu riže koordiniranjem sinteze i degradacije gena za melatonin i da se sinteza melatonina pojavljuje paralelno s degradacijom melatonina u hloroplastu i citoplazmi, a rezultirajući metabolit melatonina, 2-hidroksimelatonin, također djeluje kao signalizirajuća molekula za indukciju odbrambenih gena (Byeon i sar., 2015).

Također, Hasan i saradnici su našli da egzogena primjena melatonina može migitirati fitotoksičnost uzrokovanu djelovanjem Cd u *Solanum lycopersicum* L., moduliranjem sinteze fitohelatina, vakuolarne sekvestracije i antioksidativnog potencijala (Hasan i sar., 2015).

Nadalje, u skladu sa provedenim istraživanjem, uočen je povećan sadržaj melatonina u izbojcima i korijenu riže pod djelovanjem Cd, sugerirajući kako bi melatonin mogao igrati ključnu ulogu u odgovoru različitih dijelova biljke na Cd (Ye i sar., 2017).

Međutim, poznavanje djelovanja melatonina u odgovoru biljaka na stres uzrokovan djelovanjem Cd je još uvijek nepotpuno.

Istražen je i efekat pretretmana melatoninom. Čini se da je djelovanje potapanja sjemena u rastvor melatonina koncentracija 1 i 10 μM učinkovitije u sposobnosti klijanja sjemena tokom kasnijeg uzgoja u vodi i u prisustvu Cu^{2+} . Pretretman melatoninom povećava klijavost sjemena za oko 17% u vodi i oko 12-14% u prisustvu Cu^{2+} . U istom istraživanju koncentracija melatonina od 100 μM je bila toksična za rast biljaka. Ista je izazvala nepovoljne promjene u ćelijskoj i nuklearnoj strukturi, omela klijanje, inhibirala rast sadnica i djelovala kao prooksidans u tkivima (Posmyk i sar., 2008).

Izlaganje zelene makroalge (*Ulva*) teškim metalima u trajanju od osam dana uzrokuje povećanje koncentracije melatonina (Tal i sar., 2011). U istraživanje su bili uključeni olovo (5 mg/L), cink (30 mg/L) i kadmij (1 mg/L) koji su jednostavno dodani u vodu u kojoj je rasla alga. Najzapaženiji rast melatonina (171%) desio se kod alge izložene kadmiju iako je njegova koncentracija manja od koncentracije olova i cinka. Sva tri metala su uzrokovala povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze), a to je promjena koja ukazuje na oksidativni stres. Iako je izlaganje kadmijumu uzrokovalo značajan rast endogenih količina melatonina kod zelene alge, koncentracije hlorofila pokazale su inverznu korelaciju i smanjile su se kao rezultat izlaganja metalu. Egzogenim dodatkom melatonina vodi (50 mg/L), međutim, umanjen je oksidativni stres tako da je ublaženo smanjenje količine hlorofila. Visoke temperature vode (30°C ili 37°C prema 23°C) također su povećale količine melatonina kod zelene alge zavisno od povećanja ili smanjenja temperature. Poznato je da izloženost teškim metalima i povećana temperatura izazivaju oksidativni stres u biljkama (Abrahamsson i sar., 2003). Na osnovu ovih istraživanja predloženo je da melatonin daje veliki, a možda i osnovni odbrambeni mehanizam zelene alge protiv oksidativnog stresa. Iako u njihovom radu nije procijenjen aspekt sinteze melatonina (npr. enzimske aktivnosti) povećanje melatonina je vjerovatno posljedica njegove *de novo* sinteze.

Li i saradnici su posebno ispitali sposobnost dodanog melatonina u zaštiti biljaka od povećanih koncentracija soli (Li i sar., 2012). U ovom istraživanju sjeme jabuke (*Malus hupehensis*) staro 10 dana gajeno je hidroponično sa povećanim koncentracijama soli (100 mM) sa ili bez dodatka melatonina (1 μM). Visoke biljke u naglašenom salinitetu pretrpile su zaostatak u rastu, nižu stopu fotosinteze i smanjene količine hlorofila. Sva navedena svojstva su bila ublažena dodatkom melatonina u mediju rasta. Melatonin je također ograničio i oksidativni stres smanjenjem količine H_2O_2 i stimulisao antioksidativne enzime (katalaze, peroksidaze i askorbat peroksidaze). Poticanje aktivnosti antioksidativnih enzima je dobro

poznata funkcija melatonina i u ćelijama životinja (Pablos i sar., 1998). Vjeruje se da ovo stimulativno djelovanje melatonina uključuje receptore ćelijskih membrana za indol, strukturu koja se tek treba identificirati u biljkama.

Očekujući da će melatonin imati zaštitnu ulogu u biljnim ćelijama, visoke količine melatonina mogu se "potrošiti" u stresnim uvjetima i/ili pri povećanim intenzitetima fotosinteze. Međutim, ovom tumačenju treba pristupiti sa većom oprezom. Nedavno je mjerena deseterostruka razlika u nivoima melatonina u groždicama izloženim sunčevoj svjetlosti u poređenju sa bobicama koje su uzgojene u hladu (Boccalandro i sar., 2011). Ova pojava je protumačena kao direktno djelovanje sunčeve svjetlosti na sadržaj melatonina u grožđu - što je sunčeva svjetlost veća, manja je količina melatonina - zbog njegove "potrošnje" u ulozi antioksidansa (Tan i sar., 2012; Arnao i Hernández-Ruiz, 2013).

5.2.1. Sadržaj teških metala u analiziranim biljnim vrstama

Biodostupnost cinka uvelike ovisi o pH vrijednosti zemljišta. Promjene u biodostupnosti metala povezane sa pH vrijednošću pokazuju da se smanjenjem pH povećava topljivost Zn (Sauve i sar., 1997). Organske materije mogu ometati dostupnost jona metala u biljkama. COO⁻ grupe u čvrstim i otopljenim organskim materijama formiraju stabilne komplekse sa metalima (Baker i Senft, 1995). Stoga, povećanjem količine organske materije prisutne u zemljištu povećava se i mogućnost formiranja tih kompleksa. Inače, biljke nisu sposobne da apsorbuju velike metalne komplekse pa se tako biodostupnost metala smanjuje (Reichman, 2002). Biljke su razvile brojne mehanizme u vezanju metala iz zemljišta i njihovom transportu unutar same biljke. Unos metala u korijen biljke je kompleksan proces koji uključuje prijenos metala iz zemljišta na površinu korijena i unutar ćelija korijena. Razumijevanje procesa unosa je otežano kompleksnom prirodom rizosfere koja je u kontinualnoj dinamičkoj promjeni u interakciji sa biljnim korijenom, zemljištem koje ga stvara i mikroorganizmima koji žive unutar rizosfere (Laurie i Manthey, 1994).

5.2.1.1. Uticaj tretmana zemljišta na sadržaj i biodostupnost cinka

Sadržaj cinka varira u opsegu između 0,6 i 83 ppm zavisno od biljne vrste. Biljke usvajaju ovaj metal u obliku jona Zn²⁺, ZnCl⁺ i Zn-helata za razliku od Fe, Mn, Cu i Mo. Slično kao i bakar, cink se apsorbuje iz zemljišta aktivnim putem, pri čemu na njegovo usvajanje negativno djeluju visoke koncentracije kalcija i magnezija.

Biološka i fiziološka uloga cinka je ogromna budući da učestvuje u sintezi DNK, RNK, proteina kao i u sintezi biljnog hormona auksina. Minimalna potrebna koncentracija cinka u suhoj materiji biljaka iznosi 15-30 ppm. Biljke koje su posebno osjetljive na nedostatak cinka su kukuruz, lan i soja, dok su žita posebno otporna na njegov nedostatak. Višak cinka u biljkama se javlja uglavnom na kiselim podlogama. Gornja granica koncentracije cinka koju biljka može da podnese je između 200-500 ppm na suhu masu lista. Koncentracija Zn u suhoj materiji biljaka je veoma različita i kreće se u rasponu između 1 i 10 000 mg/kg. Usljed njegovog nedostatka smatra se da koncentracija Zn između 10 i 20 mg/kg suhe materije ima jako toksičan, čak letalan efekat na biljku (Živanovic, 2010).

Prema rezultatima Poljoprivrednog Zavoda u Bihaću zemljište korišteno za gajenje biljaka je sadržavalo 96,08 mg/kg cinka i prije tretmana sa $ZnSO_4$.

U literaturi se navodi da je srednja koncentracija cinka u zemljištu oko 55 mg Zn/kg (Alloway, 2008). Također, prikazan je i jasan trend niskih koncentracija cinka u pješćanim zemljištima i višim koncentracijama u zemljištu sa većim sadržajem gline (Alloway, 2008).

Faktori koji utiču na dostupnost cinka biljkama su: ukupan sadržaj cinka, pH, sadržaj organskih materija, gline, $CaCO_3$, mikrobne aktivnosti u rizosferi, vlaga, koncentracija elemenata u tragovima, makronutrijenata (posebno fosfora) i klima (Reichman, 2002).

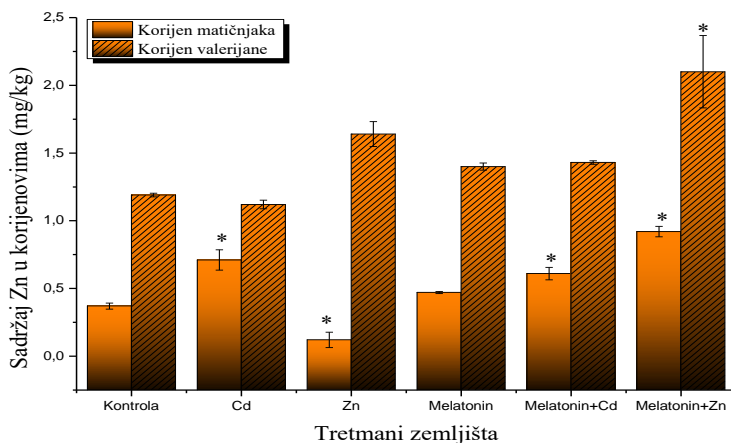
Na slici 33 predstavljeni su dobiveni rezultati za koncentracije cinka a) u korijenovima i b) listovima matičnjaka i valerijane.

Nakon provedene analize sadržaja teških metala u listu i korijenu ispitivanih biljnih vrsta vidi se da su veće koncentracije Zn usvojene od strane lista. Sa slike 33a može se zapaziti linearan trend rasta koncentracije Zn u korijenovima prema redosljedu: kontrola < Cd < Zn za obje biljne vrste. Međutim, najznačajnije povećanje koncentracije ovog metala u odnosu na kontrolu bilježe korijenovi matičnjaka i valerijane pretretirani egzogenim melatoninom i tretirani jonima Zn (0,922 i 2,1 mg/kg Zn).

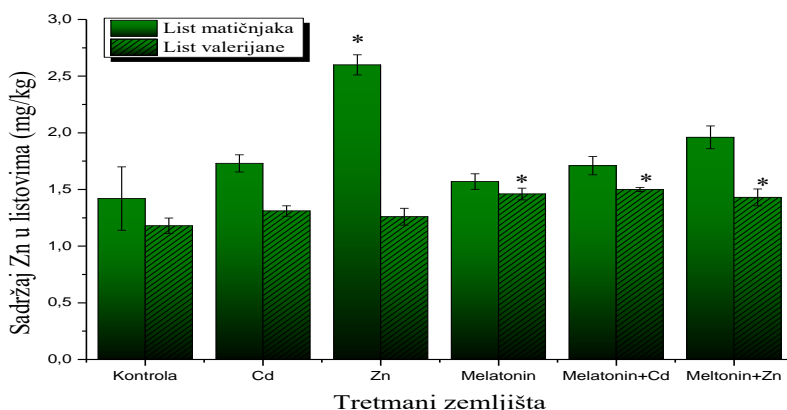
Cink pripada grupi elemenata čija je pokretljivost kroz različite dijelove biljaka osrednja. U slučaju kada je njegova koncentracija u zemljištu mala, izuzetno je slab intenzitet prenošenja iz starijih u mlađe dijelove biljke. Budući da je koncentracija Zn u ispitivanom zemljištu dosta visoka, nije se taložio u korijenu biljaka, već u listu gdje su zabilježene njegove veće koncentracije u ispitivanim biljnim vrstama (slika 33b). Statistički najznačajnije povećanje javlja se u listu matičnjaka tretiranim jonima Zn i iznosi 4,603 mg/kg suhe materije. Kao i kod korijena, listovi biljaka pretretirani melatoninom pokazuju veću akumulaciju ovog metala u odnosu na kontrolu (1,574 mg/kg lista matičnjaka i 1,456 mg/kg lista valerijane). Također, listovi biljaka pretretirani melatoninom pokazuju veći afinitet prema akumulaciji Zn iz

zemljišta tretiranim ovim metalom u odnosu na netretirane biljke (1,963 mg/kg lista matičnjaka i 1,427 mg/kg lista valerijane).

a)



b)



Slika 33. Distribucija usvojenog Zn^{2+} u a) korijenu i b) listu matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

Akumulirajući 2, odnosno 2,5 puta veću koncentraciju Zn u korijenu obje ispitivane biljne vrste pretretirane melatoninom, pretretman biljaka melatoninom bi mogao biti efikasan u procesu fitoekstrakcije, odnosno fitoremedijacije zemljišta zagađenim ovim teškim metalom. U literaturi se ne može naći veliki broj radova koji prati uticaj zagađenja cinkom sa mogućnošću fitoremedijacije primjenom egzogenog melatonina. Istraživanja su pokazala da se sadržaj melatonina u korijenu ječma povećava usljed djelovanja hemijskog stresa, dosežući čak šest puta veće koncentracije u odnosu na kontrolu. Tretiranje korijena ili cijele biljke natrij-hloridom, vodonik-peroksidom i cink-sulfatom izazvalo je jasno povećanje u sadržaju melatonina. Efekat povećanja je bio veći u prisustvu H_2O_2 (10 mM) i $ZnSO_4$ (1 mM) u odnosu na NaCl (10 mM). Koncentracija melatonina je povećana za nekoliko puta u

tretiranim biljkama, a maksimum je postignut nakon 72 h u cijeloj biljci, ukazujući na veliki stepen biosinteze melatonina koji se može inducirati u korijenu. Prema autorima ovo istraživanje prvi put pokazuje direktnu vezu između agenasa stresa i promjena u količinama endogenog fitomelatonina. Iako tri pomenute supstance izazivaju stres iz različitih razloga (H_2O_2 – oksidativni, NaCl – osmotski i Zn - toksični stresni agens) primijećen je sličan odgovor biljaka u povećanju koncentracije melatonina (Arnao i Hernandez-Ruiz, 2013).

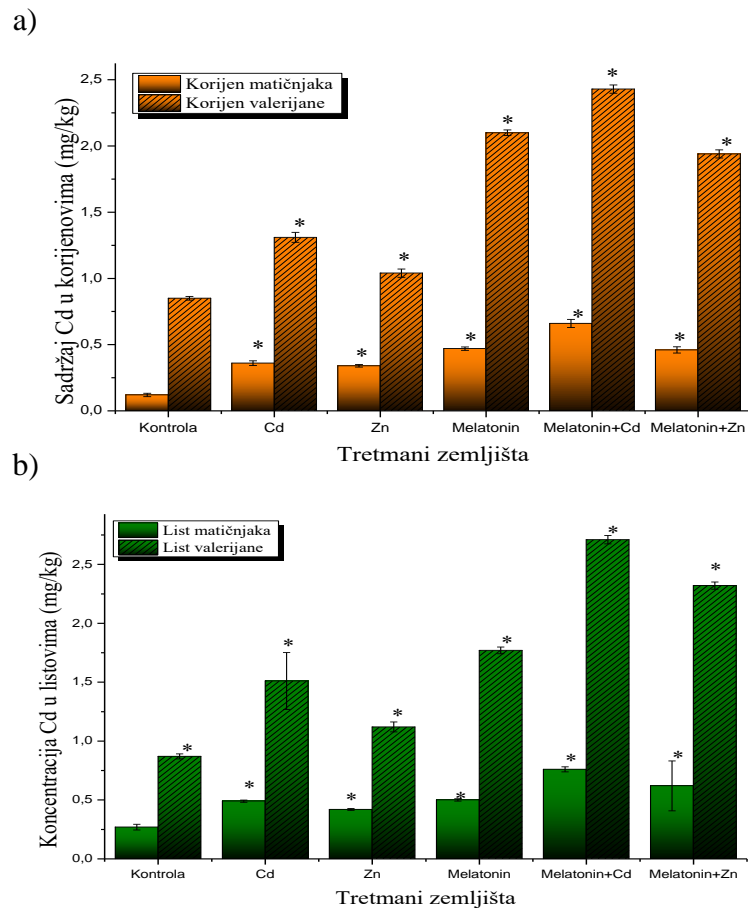
5.2.1.2. Uticaj tretmana zemljišta na sadržaj i biodostupnost kadmija

Zastupljenost kadmija u zemljištu uglavnom zavisi od pH vrijednosti zemljišta, ali i od prisustva drugih kationa. Kadmij može vrlo lako i brzo da se apsorbuje iz podloge u biljku, nakon čega se putem sistema ksilema transportuje kroz biljku. Izuzetno je toksičan element zbog svog visokog afiniteta za tiolne grupe (SH) u enzimima i drugim proteinima. Visoke koncentracije kadmija u biljkama mogu poremetiti metabolizam željeza.

Nakon ispitivanja zemljišta prije kontaminacije utvrđeno je da je zemljište i prije dodavanja sulfatnih soli kadmija u sebi sadržalo 0,41 mg/kg ovog metala. Akumulacija kadmija po organima različitih biljnih vrsta, prikazana na slici 34, pokazuje značajnu zavisnost od biljne vrste, pri čemu se kod valerijane uočava znatno veća sposobnost akumulacije ovog teškog metala i u korijenu i listu u poređenju sa matičnjakom. Veće koncentracije Cd^{2+} su uočene u sva tri tretmana sa egzogeno dodanim melatoninom (melatonin, melatonin+ Zn^{2+} , melatonin+ Cd^{2+}). Iako kalcij i cink smanjuju usvajanje Cd, a transport u velikoj mjeri zavisi od koncentracije ovog elementa u okolini, u našim uzorcima prisustvo jona cinka nije smanjilo usvajanje kadmija, osim neznatnije u korijenu obje biljne vrste pretretirane melatoninom. Razlog tome mogu biti relativno niske koncentracije cinka uočene i u korijenu i listu obje biljne vrste.

Biljke matičnjaka tretirane Zn pokazuju veću akumulaciju Cd u odnosu na kontrolu: 0,344 mg/kg u korijenu i 0,416 mg/kg u listu matičnjaka. Isto tako, povećana je akumulacija Cd izmjerena u organima valerijane tretirane sa jonima Cd u odnosu na kontrolu (0,851 i 0,868 mg/kg korijen i list, pojedinačno) i iznosila je 1,038 mg/kg u korijenu, odnosno 1,121 mg/kg u listu valerijane. Tretman melatoninom uzrokovao je blago povećanje akumulacije Cd u korijenu u odnosu na kontrolu (0,472 mg/kg korijena matičnjaka i 2,104 mg/kg korijena valerijane). Sa aspekta fitoekstrakcije melatonin je također pokazao pozitivno djelovanje u biljkama pretretiranim ovih hormonom u smislu akumulacije većih količina Cd. Povećana akumulacija javlja se u obje ispitivane biljne vrste tretirane i Zn i Cd. Tako je koncentracija

Cd kod korijena biljaka tretiranih Zn i melatoninom iznosila 0,663 mg/kg korijena matičnjaka i 2,431 mg/kg korijena valerijane, što su 2 puta veće koncentracije u odnosu na biljke tretirane cinkom bez melatonina (0,364 i 1,310 mg/kg korijena matičnjak i valerijane, pojedinačno). Slična pojava povećane akumulacije Cd je primijećena i kod lista obje biljne vrste, što ukazuje na pozitivno djelovanje melatonina u fitoremedijaciji zemljišta zagađenog teškim metalima.



Slika 34. Distribucija usvojenog Cd^{2+} u a) korijenu i b) listu matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

Sa aspekta fitoekstrakcije, do veće varijabilnosti u akumulaciji kadmija došlo je u listovima, nego u korijenovima matičnjaka i valerijane. Tako je valerijana, koja se pokazala kao efikasnija za fitoekstrakciju kadmija, akumulirala skoro tri puta veće koncentracije ovog metala u listovima i korijenovima, u poređenju sa matičnjakom. Oba ispitivana metala pokazuju veću mogućnost translokacije, što predstavlja preduslov za efikasnu fitoekstrakciju i nakupljanje metala u nadzemnim dijelovima biljaka.

Ispitivanja su pokazala da 30-60% kadmija, sadržanog u biljkama dolazi direktno iz atmosfere, a 40-60% iz zemljišta. Jedan od osnovnih načina kojima kadmij dospjeva u

zemljište su mineralna đubriva, koja se dobijaju razlaganjem sirovih fosfata mineralnim kiselinama. Iako se pokazalo da se kadmij usvojen iz hranljive podloge najvećim dijelom zadržava u korijenu (Mitić, 2013), dobijeni rezultati pokazuju približno istu koncentraciju ovog elementa u listu i korijenu.

U literaturi se može naći veliki broj radova koji prati uticaj zagađenja kadmijumom. Tako naprimjer, ispitivana je tolerancija, akumulacija i translokacija Cd u biljkama sive topole, *Populus canescens* (hibrida *Populus tremule* L. x *Populus alba* L.), u hidroponom eksperimentu, gdje su topole bile izložene kadmijem u opsegu koncentracija od 0, 10, 30, 50 i 70 μM u trajanju od 28 dana uz praćenje akumulacija metala. Autori su ustanovili da se najveća koncentracija kadmija nalazi u korijenu, a najmanja u listu ove biljne vrste. Prikazana je i do 20 puta veća akumulacija Cd u korijenovima i 11 puta veća akumulacija u listovima u odnosu na kontrolne biljke (Dai i sar., 2013).

Efikasnost fitoekstrakcije Cd i Zn objavljena je za različite aromatske i ljekovite biljne vrste. Neke aromatske i ljekovite biljke mogu akumulirati teške metale iz kontaminiranih zemljišta (Zheljazkov i Warman 2003). Međutim, rezultati istraživanja su pokazala da matičnjak, kopriava, kamilica, korijander, bosiljak i menta nisu hiperakumulatori metala i nisu imali vrlo visok fitoremedijacijski potencijal u poređenju sa drugim biljkama, ali i da je translokacija iz korijena u izbojke veća pri manjim koncentracijama metala u zemljištu (Zheljazkov i sar., 2008).

Ranije je prikazano da melatonin može biti pomoć u poboljšanju fitoremedijativnog kapaciteta biljaka. Da bi se istražile potencijalne veze između pretretmana melatoninom i tolerancije biljaka prema stresu u okolišu, biljke graška su tretirane sa visokim količinama bakra u zemljištu. Rezultati pokazuju da kontaminacija bakrom ubija biljke graška. Međutim, dodavanjem melatonina u zemljište značajno je povećana njihova tolerancija na onečišćenje bakrom, a time je povećan i njihov opstanak. Na osnovu objavljenih preliminarnih podataka, upotreba melatonina radi poboljšanja fitoremedijativnog kapaciteta različitih biljaka može biti izvediv i ekonomičan pristup protiv kontaminacije okoliša (Tan i sar., 2007a).

U skladu sa dobijenim rezultatima istraživanja, barem što se tiče unosa kadmija u ispitivane biljne vrste, predložena je i poboljšana remedijacijska efikasnost slabo zagađenog zemljišta kadmijem tretiranjem *Galinsoga parviflora* 100 μM melatoninom. Melatonin je poboljšao translokaciju Cd iz korijena u izbojke ove biljne vrste. Povoljna koncentracija melatonina uticala je i na povećanje biomase. Krompirov korov je hiperakumulator Cd i ima visoku toleranciju prema istom. Pod uvjetima niske koncentracije Cd melatonin nije samo poboljšao aktivnost antioksidativnih enzima, nego je poboljšao i transfer Cd u ćelijski zid i vakuole,

uklanjajući Cd dalje od osjetljivih dijelova ćelije, te ubrzavajući njegovu apsorpciju (Tang i sar., 2017). Zbrinjavanje metalima kontaminiranog biljnog tkiva fitoekstrakcijom ostaje problem u korištenju biljnih materijala. Iako je predloženo nekoliko pristupa fitoremedijacije (kompostiranje, spaljivanje, uništenje, piroliza, izravno odlaganje i tekuća ekstrakcija) uz slabu kontrolu procesa i dalje može doći do zagađenja okoliša (Keller i sar., 2005). Neke aromatske biljke pokazuju značajan potencijal fitoremedijacije u povećanju biodostupnosti i unosa Cd, Pb i Cu u kombinaciji sa drugim sredstvima, poput helata ili biosurfaktanata (Schmidt, 2003). Rezultati pokazuju relativno visok unos jona kadmija u biljne organe, ali slabija translokacija u nadzemne dijelove biljaka, posebno lista, ne svstava valerijanu u grupu dobrih fitoremedijatora.

5.2.2. Uticaj melatonina i teških metala na morfometrijske i fiziološke parametre

Brojna istraživanja dokazuju kako toksične koncentracije teških metala doprinose promjenama morfoloških karakteristika biljnih vrsta, dovodeći tako do usporenog rasta, redukcije prečnika i visine biljaka, te smanjenja biomase biljnih organa. Pri visokim koncentracijama teških metala očekivano je i dugotrajno onesposobljavanje zemljišta za gajenje usjjeva, voća i povrća (Duarte i sar., 2007).

Iako nekoliko bitnih prijelaznih metala (cink, željezo, bakar, kobalt i mangan) učestvuju u kontroli mnogih metaboličkih i signalnih puteva, njihova bogata koordinacijska hemija i redoks svojstva mogu dovesti do narušavanja redoks homeostaze, transporta, odjeljivanja i vezivanja na određenim ćelijskim i tkivnim sastavnim dijelovima. Sve je više rezultata koji ukazuju na to da toksični i kancerogeni metali imaju sposobnost interakcije s nuklearnim proteinima i DNK uzrokujući oksidativna oštećenja bioloških makromolekula (Valko i sar., 2005). Istraživane su različite funkcije melatonina u višim biljkama, neke detaljnije od drugih, ali u svim slučajevima podaci su nepotpuni. Među brojnim istraživanjima u kojima se pokušavala identificirati specifična uloga melatonina u biljkama je i njegova uloga u reguliranju rasta. Melatonin djeluje kao promotor rasta etiolirane lupine (*Lupinus albus*), djelujući na sličan način kao i auksin, indoli-3-sirćetna kiselina, te potiče rast hipokotila u mikromolarnim koncentracijama. U isto vrijeme, primjećeno je i njegovo inhibitorno djelovanje pri višim koncentracijama. Povoljno djelovanje melatonina na rast je jednako 63% djelovanju IAA, što se smatra značajnim auksinskim djelovanjem (Arnao i Hernandez-Ruiz, 2014). Uticaj egzogenog melatonina i akumulacije teških metala na morfometrijske i fiziološke parametre ispitivanih biljnih vrsta prikazane su u tabeli 15.

Tabela 15. Prosječne vrijednosti praćenih 12 morfometrijskih i fizioloških parametara za 12 kombinacija modaliteta biljne vrste i hemijskog spoja

Biljna vrsta	Tretman	Visina biljke (cm)	Prečnik biljke (cm)	Masa svježje biljke (g)	Masa suhe biljke (g)	Razvijenost korijena (cm)	Masa svježeg korijena (g)
Matičnjak	Kontrola	54,80 ± 0,874 ^{bc}	50,97 ± 1,448 ^{bc}	408,03 ± 29,144 ^c	175,47 ± 12,569 ^{bc}	29,71 ± 0,701 ^{bc}	112,75 ± 7,537 ^b
	Cd	46,79 ± 1,813 ^a	39,61 ± 1,442 ^a	228,53 ± 29,008 ^a	106,83 ± 14,057 ^a	25,20 ± 0,788 ^{ab}	62,97 ± 6,810 ^a
	Zn	51,55 ± 1,046 ^{abc}	48,53 ± 1,201 ^{bc}	288,23 ± 33,490 ^{abc}	135,15 ± 16,450 ^{abc}	30,27 ± 1,361 ^{bc}	71,20 ± 8,256 ^a
	Melatonin	57,78 ± 1,719 ^c	53,71 ± 1,388 ^c	405,47 ± 37,926 ^{bc}	173,34 ± 14,494 ^{bc}	33,88 ± 0,967 ^c	89,83 ± 5,406 ^{ab}
	Melatonin+Cd	51,61 ± 1,578 ^{ab}	45,36 ± 2,106 ^{ab}	280,38 ± 27,003 ^{ab}	112,69 ± 11,078 ^a	23,44 ± 1,548 ^a	63,05 ± 7,391 ^a
	Melatonin+Zn	55,17 ± 1,308 ^{bc}	50,63 ± 1,655 ^{bc}	268,47 ± 27,360 ^a	117,69 ± 14,322 ^{ab}	34,01 ± 2,025 ^c	69,53 ± 7,847 ^a
Valerijana	Kontrola	38,77 ± 1,083 ^b	48,34 ± 1,185 ^b	365,67 ± 31,297 ^{bc}	87,86 ± 9,093 ^{ab}	21,21 ± 0,569 ^{bc}	178,00 ± 15,945 ^{ab}
	Cd	28,69 ± 1,590 ^a	39,13 ± 1,862 ^a	273,67 ± 17,207 ^{ab}	64,43 ± 5,243 ^a	16,42 ± 0,707 ^a	139,67 ± 11,786 ^a
	Zn	30,99 ± 1,543 ^a	39,35 ± 2,339 ^a	479,67 ± 43,533 ^c	113,34 ± 11,410 ^b	23,09 ± 0,930 ^c	232,33 ± 26,380 ^b
	Melatonin	38,45 ± 1,546 ^b	51,20 ± 1,530 ^b	409,47 ± 22,615 ^{ab}	71,37 ± 6,239 ^a	20,73 ± 0,684 ^{bc}	125,67 ± 11,200 ^a
	Melatonin+Cd	32,93 ± 1,428 ^{ab}	47,36 ± 1,791 ^b	238,87 ± 19,152 ^a	57,75 ± 5,716 ^a	19,27 ± 0,603 ^{ab}	115,67 ± 12,496 ^a
	Melatonin+Zn	38,15 ± 1,454 ^b	49,23 ± 2,100 ^b	297,20 ± 30,146 ^{ab}	67,92 ± 7,171 ^a	20,39 ± 0,903 ^{bc}	128,67 ± 14,388 ^a

Biljna vrsta	Tretman	Masa svježje Stabljike (g)	Masa suhog Korijena (g)	Masa suhe Stabljike (g)	Hlorofil A (mg/g)	Hlorofil B (mg/g)	Karetinoidi (mg/g)
Matičnjak	Kontrola	297,09 ± 23,22 ^{bc}	41,73 ± 3,568 ^b	133,74 ± 10,532 ^{bc}	1,74 ± 0,032 ^b	0,58 ± 0,025 ^{bc}	1,21 ± 0,014 ^c
	Cd	165,55 ± 23,205 ^a	28,96 ± 3,435 ^{ab}	77,87 ± 10,980 ^a	1,44 ± 0,024 ^a	0,50 ± 0,023 ^{ab}	0,96 ± 0,010 ^a
	Zn	217,03 ± 27,290 ^{abc}	30,40 ± 4,106 ^{ab}	104,75 ± 13,994 ^{abc}	1,60 ± 0,035 ^{ab}	0,56 ± 0,014 ^{bc}	1,14 ± 0,039 ^{bc}
	Melatonin	315,64 ± 33,696 ^c	34,71 ± 1,970 ^{ab}	138,63 ± 13,362 ^c	1,46 ± 0,038 ^a	0,46 ± 0,017 ^a	0,94 ± 0,034 ^a
	Melatonin+Cd	217,33 ± 22,998 ^{abc}	23,65 ± 2,528 ^a	89,04 ± 9,612 ^{ab}	1,66 ± 0,069 ^b	0,54 ± 0,031 ^{abc}	1,00 ± 0,042 ^{ab}
	Melatonin+Zn	198,94 ± 22,916 ^{ab}	29,91 ± 2,849 ^{ab}	87,79 ± 12,398 ^{ab}	1,71 ± 0,060 ^b	0,61 ± 0,031 ^c	1,02 ± 0,040 ^{ab}
Valerijana	Kontrola	187,33 ± 18,767 ^{bc}	55,23 ± 6,853 ^{ab}	32,63 ± 2,889 ^b	1,14 ± 0,087 ^a	0,35 ± 0,025 ^a	0,72 ± 0,058 ^a
	Cd	134,00 ± 7,734 ^{ab}	40,46 ± 4,323 ^a	23,97 ± 1,481 ^{ab}	1,35 ± 0,057 ^b	0,49 ± 0,019 ^c	0,91 ± 0,039 ^b
	Zn	247,33 ± 19,742 ^c	70,36 ± 8,674 ^b	43,00 ± 3,178 ^c	1,34 ± 0,007 ^b	0,52 ± 0,020 ^c	0,90 ± 0,019 ^b
	Melatonin	169,67 ± 13,684 ^{ab}	39,55 ± 4,381 ^a	31,79 ± 2,690 ^b	1,73 ± 0,021 ^c	0,59 ± 0,012 ^d	1,12 ± 0,006 ^c
	Melatonin+Cd	116,33 ± 10,850 ^a	36,85 ± 5,302 ^a	20,90 ± 1,584 ^a	1,22 ± 0,017 ^{ab}	0,40 ± 0,007 ^{ab}	0,82 ± 0,009 ^{ab}
	Melatonin+Zn	158,00 ± 18,033 ^{ab}	42,30 ± 5,272 ^a	25,62 ± 2,469 ^{ab}	1,39 ± 0,017 ^b	0,46 ± 0,009 ^{bc}	0,91 ± 0,012 ^b

Vrijednosti označene istim slovom statistički se ne razlikuju (Tukey test; p<0,05)

Pod uticajem cinka i kadmija došlo je do statistički značajnog smanjenja u visini valerijane, dok se kod matičnjaka značajna redukcija uočava samo kod biljaka tretiranih jonima kadmija. Egzogeni melatonin kod valerijane nije poboljšao rast te biljke, ali kod matičnjaka se primjećuje povećanje visine. Također, kod biljaka tretiranih teškim metalima u biljkama pretretiranim melatoninom izostaje negativno djelovanje metala na rast biljaka, gdje su kod obje biljne vrste mjerene iste visine u slučaju tretmana kadmijem ili čak više u slučaju tretmana cinkom. Ova pojava se može objasniti činjenicom da se jasni znaci viška ovog elementa javljaju kada njegova koncentracija u suhoj materiji prelazi 300 do 5000 mg/kg. U takvim slučajevima kod biljaka dolazi do nižeg rasta, smanjenja korijenovog sistema, nastanka sitnih listova i nekroze (Mickovski Stefanovic, 2012).

Slična situacija se javlja i mjerenjem prečnika biljaka. Djelovanjem jona kadmija kod obje biljne vrste došlo je do značajnijeg smanjenja u prečniku biljaka u odnosu na kontrolu. Cink je pokazao inhibitorski efekat samo kod valerijane. Djelovanjem egzogenog melatonina dolazi do povećanja prečnika biljaka, iako povećanje nije statistički značajno. Isto tako, slabo je inhibitorski djelovanje teških metala u biljkama pretretiranim egzogenim melatoninom.

Promjene u biomasi matičnjaka ukazuju da oba teška metala djeluju inhibirajuće, iako su statistički značajne razlike samo kod biljaka tretiranih Cd u odnosu na kontrolu. Sami egzogeni melatonin nije imao uticaja na masu svježih biljaka matičnjaka. Međutim, tretman sa Cd u biljkama pretretiranim melatoninom je imao manji uticaj na smanjenje biomase, čime se potvrđuje djelovanje melatonina u zaštiti biljnih ćelija od stresa.

Biomasa korijena matičnjaka je najviše smanjena nakon tretmana sa teškim metalima u odnosu na biomasu stabljike.

Izloženost biljaka valerijane jonima Cd nije izazvalo značajnije smanjenje biomase u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, Zn je djelovao stimulirajuće na biomasu i izazvao statistički značajno povećanje svježe mase u odnosu na kontrolu i tretman kadmijem. Sami egzogeni melatonin nije imao uticaja na masu svježih biljaka valerijane, a čini se da nije imao uticaja ni u poboljšanju otpornosti biljaka prema djelovanju jona teških metala. Slični su i dobijeni rezultati biomase korijena i stabljike valerijane.

Od morfoloških karakteristika u ovom eksperimentu mjerena je i razvijenost korijena. Povećanjem dužine glavnog i bočnih korijena poboljšava se dostupnost vodi i hranjivim materijama. Matičnjak nije pokazao statistički značajne promjene u razvijenosti korijena pri tretmanu sa Cd ni Zn u odnosu na kontrolu. Slično tome, ni u biljkama tretmanim povećanim koncentracijama Cd i Zn uz pretretman melatoninom ne javljaju se statistički značajne razlike.

Međutim, tretiranje egzogenim melatoninom djeluje blago stimulirajuće na razvijenost korijena u odnosu na kontrolu i u odnosu na tretman jonima Cd.

Valerijana pokazuje malo drugačije rezultate. Naime, Cd djeluje inhibirajuće na razvijenost korijena ove biljke, dok Zn opet nije izazvao statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, ali razlike se javljaju u odnosu na biljke tretirane jonima Cd. Egzogeni melatonin je djelovao blago stimulirajuće na ovu morfološku karakteristiku u odnosu na kontrolu, ali isto tako povećao otpornost biljaka tretiranih Cd u smislu povećanja razvijenosti korijena.

Dobro razvijen korijenov sistem je očito presudan za vegetativni rast i razvoj sjemena i ploda. Odgovarajući korijenov sistem osigurava učinkovit unos vode i hranjivih tvari i pruža solidno sidro za biljke u sprečavanju oštećenja uslijed kretanja nadzemnog tkiva. Bočni korijeni su od posebnog značaja jer su vrlo dinamične i fiziološki aktivne komponente korijenovog sistema. Također, važno je da arhitektura korijena bude plastična ovisno o sadržaju hranjivih tvari u zemljištu, heterogenosti matrice zemljišta i biotskim interakcijama. Bočni rast korijena je vrlo složen proces i reguliran je u velikoj mjeri auksinom (Seo i Park 2009).

U skladu sa dobivenim rezultatima, dokazano je da joni kadmija smanjuju ćelijski rast i ograničavaju širinu prečnika. Ranija istraživanja su pokazala da korijeni izloženi jonima Cd pokazuju povećanu produkciju etilena, hormona koji inhibira ćelijski rast. Također dovode do akumulacije vodonik-peroksida koji uzrokuje lignifikaciju ćelijskog zida aktiviranjem sinteze lignina, čime se sprječava istegljivost zidova. Prema tome, inhibicija rasta je pleotropski efekat izazvan direktnom inhibicijom važnih enzimskih sistema kao i ometanjem ćelijskog signaliziranja od strane teških metala (Barcelo, 1990). Veće koncentracije Cd u biljkama utiču inhibitorno na metabolizam željeza, izazivaju hlorozu i time smanjuju intenzitet fotosinteze. Isto tako, visoke koncentracije kadmija inhibiraju disanje i transport elektrona u procesu oksidativne fosforilzacije. Kadmij inhibira transpiraciju, kao i pokrete ćelija zatvaračica stominog aparata (Barcelo, 1990).

Jedan od prvih eksperimenata o uticaju melatonina na neke morfološke karakteristike biljaka je iz 2000. godine, gdje je pokazano da u tkivima melatonin vrši interakciju sa auksinom u kontroli i proizvodnji korijena i izbojaka kantariona, *Hypericum perforatum* L. (Murch i sar., 2000). Otad se javljaju brojna istraživanja koja ukazuju na ulogu melatonina u posredovanju ili imitiranju auksinskog djelovanja.

Nedavno, pojavili su se radovi koji otkrivaju da niže koncentracije melatonina vrše stimulatивно djelovanje na korijen kako je primjećeno kod gospine trave, lista divljeg senfa, korijena trešnje i vučike. U svim istraživanjima sposobnost melatonina u poboljšanju bočnog rasta korijena umnožava djelovanje IAA. Još jedna značajka koja je postala očita u dva

pomenuta istraživanja je da za bočno istežanje korijena odgovor na melatonin može biti koncentracijski specifičan. Dakle, niže količine melatonina su učinkovitiji induktori rasta korijena od bilo koje više testirane doze. Doista, u primijenjenoj gornjoj ekstremnoj koncentraciji melatonina (10-100 μM), indol može ograničiti bočni rast korijena (Chen i sar., 2009; Sarropoulon i sar., 2012).

Dok je djelovanje melatonina na ukorjenjivanje opisano kao auksinsko djelovanje, Pelággio-Flores i saradnici (2012) su zaključili da je efekat melatonina na ukorjenjavanje neovisna o IAA. To je dokumentirano pomoću markera osjetljivog na auksin, a ugrađenog u sadnicama *Arabidopsis thaliana*. Ishod ovih istraživanja je da melatonin ne aktivira ekspresiju gena inducibilnih auksinom koji dovode do morfogenetskog rasta korijena. Za razliku od drugih radova ti autori ne nalaze da visoke koncentracije melatonina (do 600 μM) ometaju grananje korijena u pomenutoj biljnoj vrsti (Pelaggio-Flores i sar., 2012).

U skladu sa provedenim istraživanjem, transgene biljke riže (*Oryza sativa* CV. Dongjin) bogate melatoninom pokazale su veću biomasu, ali i odgođeno cvjetanje i prinos (Byeon i Back, 2014). Pokazalo se da potapanje sjemena u rastvor melatonina povećava klijanje, poboljšava visinu biljke i biomasu, te povećava prinos usjeva.

U istraživanju na sadnicama crvenog kupusa (*Brassica oleracea rubrum*) pokazana je odbrambena uloga melatonina nakon tretmana biljaka bakrom. U ovom slučaju, sjeme kupusa je tretirano sa jednom od tri koncentracije melatonina (1, 10 ili 100 μm) i nakon klijanja sadnicama je dodan bakar (kao 0,5 mM CuSO_4) u vodi. U sjemenkama inkubiranim sa 1 ili 10 μM rastvorom melatonina, značajno je smanjen bakrom posredovan oksidativni stres, izazvan povećanom lipidnom peroksidacijom i blokadom endoreplikacije DNK. Nasuprot tome, koncentracija melatonina od 100 μM imala je suprotan efekat i poboljšala je oksidativna oštećenja u sadnicama tretiranih bakrom. Ovi rezultati ukazuju da pod određenim uslovima visoke koncentracije melatonina mogu biti toksične za biljke (Posmyk, i sar., 2008).

Moguća uloga melatonina kao promotora rasta je dosta istraživana. Nađene su značajne razlike u djelovanju različitih koncentracija melatonina na rast korijena kod sadnica starih 14 dana. Tretman 0,1 mM melatoninom povećao je izduživanje korijena, dok su koncentracije 500 i 1000 mM imale značajan inhibitorski efekat. Slični rezultati su dobijeni i u *Brassica juncea*, gdje je također primijećena stimulacija rasta korijena pri koncentraciji melatonina od 0,1 mM i značajna inhibicija uz 100 mM melatonin etioliranim sadnicama (Chen i sar., 2009). Međutim, inhibitorsko djelovanje niskih koncentracija melatonina dobijeno je u istraživanju nekih monokotiledonskih vrsta (Hernandez-Ruiz i sar., 2005).

Melatonin ima isti prekursor i slične fiziološke funkcije kao IAA. Potiče rast pri niskim i inhibira rast pri visokim koncentracijama. U ranijem istraživanju, 0,1 mM melatonin imao je maksimalni pozitivno djelovanje na izduženje korijena 2 dana starih sadnica senfa (Arnao i Hernandez-Ruiz, 2006). Endogeni slobodni sadržaj IAA također je povećan kod niskih koncentracija melatonina (0,1 i 0,2 mM) (Chen i sar., 2009). Tako je moguće da je stimulacija rasta korijena niskim koncentracijama melatonina zapravo aktivirana sintezom indol-3-sirćetne kiseline stimulirane melatoninom. Pri visokim koncentracijama melatonina, međutim, IAA nije bio značajno povećana, dok je istežanje korijena bilo snažno inhibirano. Odnos između ova dva biljna hormona ostaje nepoznat (Chen i sar., 2009).

Pozitivni efekti melatonina su često pojačani pod stresnim uvjetima, kada se biljka prilagođava promjenama u okolišu, što dalje sugerira na značaj melatonina kao medijatora ponašanja. Navode potvrđuju i nedavna istraživanja u kojima je nađeno da je u paradajzu (*S. Lycopersicum*), promovisanje bočnih korijenova melatoninom posredovano signaliziranjem dušikovim oksidom, iako je prikazano i auksinsko djelovanje posredovano melatoninom (Wen i sar., 2016). Stoga, u moduliranju rasta korijena vjerovatno učestvuje melatonin ovisan i neovisan o auksinu (Erland i sar., 2017).

Melatonin ima visok afinitet prema Ca^{2+} -aktiviranom kalmodulinu (CaM), koji inhibira unutarćelijske funkcije ovisne o Ca^{2+} /CaM (Hardeland i sar., 2007). Pokazano je da inhibitori CaM smanjuju rast korijena i da se ovo inhibitorско djelovanje može neutralizirati dodavanjem egzogenog CaM (Xing i sar., 1998). Dakle, negativno djelovanje visokih koncentracija melatonina na izduženje korijena može biti rezultat melatoninom povezanih promjena u CaM antagonizmu. Elongacija ćelija je ključni proces u rastu korijena.

ROS, uključujući hidroksilni radikal, navodno aktiviraju Ca^{2+} kanale koji omogućuju ulaz Ca^{2+} , što pojačava elongaciju ćelija (Foreman i sar., 2003). Druga studija pokazala je da hidroksilni radikal čini membrane ćelija propusnijim, što također dovodi do njihove povećane elongacije (Schopfer, 2001). Štoviše, jedan od metabolita koji nastaju kada melatonin uklanja radikale je *N1-acetil-N2-formil-5-metoksikinuramin* (AFMK) (Tan i sar., 2007b), koji vjerojatno funkcionira kao antioksidans (Tan i sar., 2007a). Stoga, visoke koncentracije melatonina i AFMK mogu smanjiti ROS u ćelijama korijena i time inhibirati djelovanje ROS (Afreen i sar., 2006). Međutim, tačan mehanizam inhibicijskog djelovanja melatonina na istežanje korijena zahtijeva daljnju istragu (Chen i sar., 2009).

Egzogeni melatonin je potencijalni biljni biostimulator, u produžavanju života sjemena nakon izlaganja stresu kao i u usporavanju starenju lista nakon cvjetanja biljaka. Stoga bi njegova

primjena u agronomiji mogla rezultirati dobrom, izvodljivom i jeftinom metodom prevenirajući stres i poboljšavajući rast i razvoj biljaka pod različitim uvjetima.

Nekoliko zaključaka proizlazi iz dobijenih rezultata. Prikazano je da sadržaj melatonina u obje biljne vrste ovisi o uvjetima rasta, tretmana teškim metalima. Ti se podaci mogu koristiti za prehrambenu industriju (u poboljšanju kvaliteta hrane i biljnih osobina agronomskog interesa, kao što je povećanje zračne biomase zelenih jestivih biljaka ili poboljšati uvjete za skladištenje sjemena).

Parametri fotosinteze su znatno povezani sa sadržajem pigmenata hloroplasta, prije svega hlorofila a, b i karotenoida. Poznato je da teški metali ometaju fotosintezu inhibitorno djelujući na biosintezu hlorofila i dovodeći do poremećaja strukture tilakoidnih membrana.

Smanjenje u sadržaju hlorofila može biti posljedica smanjene sinteze hlorofila zbog aktivnosti enzima, zamjene Mg sa teškim metalima u strukturi hlorofila, redukcije izvora esencijalnih metala uključenih u sintezu hlorofila (naprimjer Fe^{2+} i Zn^{2+}), narušavanje strukture membrane hloroplasta izazvane lipidnom peroksidacijom, kao i smanjenje gustoće, veličine i sinteze hlorofila (Rastgoo i Alemzadeh, 2011). Prosječna koncentracija hlorofila a i standardna greška u matičnjaka iznosi $1,60 \pm 0,052$, hlorofila b $0,54 \pm 0,022$, a karotenoida $1,05 \pm 0,044$ mg/g FW (tabela 15).

Povišene koncentracije kadmija uticale su na smanjenje sadržaja hlorofila a sa 1,74 na 1,61 mg/g FW, kao i karotenoida sa 1,21 na 0,96 mg/ FW u listu matičnjaka. Na sadržaj hlorofila b kadmij nije imao uticaj kod ove biljne vrste. Tretman biljaka cinkom nije uticao na značajnije promjene u sadržaju pigmenata hloroplasta u odnosu na kontrolu. Smanjenje sadržaja ispitivanih biljnih pigmenata primijećeno je u listovima matičnjaka tretiranim biljnim hormonom. Interesantno, biljke pretretirane melatoninom u onečišćenom zemljištu kadmijem i cinkom pokazuju slične vrijednosti biljnih hormona sa kontrolnim listovima, što ukazuje na mogućnost djelovanja melatonina u odbrani biljaka protiv štetnog djelovanja teških metala.

Prosječna koncentracija i standardna greška hlorofila a u valerijane iznosi $1,36 \pm 0,083$, hlorofila b $0,47 \pm 0,035$, a karotenoida $0,90 \pm 0,054$ mg/g FW (tabela 15).

Za razliku od matičnjaka u radu su dobivene značajno više koncentracije hlorofila a, b i karotenoida u listovima valerijane tretirane egzogenim melatoninom (1,73, 0,59 i 1,12 mg/g FW) u odnosu na kontrolne listove (1,14, 0,35 i 0,72 mg/g FW). Također, tretman teškim metalima imao je sličan stimulativni efekat. Pretpostavlja se da je primjenjena koncentracija teških metala bila niža od koncentracije koja bi mogla uticati na smanjenje biljnih pigmenata. Sa druge strane, ova biljna vrsta smatra se korovom i kao takva lakše podnosi nametnute uslove oksidativnog stresa.

Ranije je prikazano kako redukciju fotosintetske aktivnosti i transpiracije izazivaju joni teških metala kao što su joni Cd^{2+} i Zn^{2+} (Hermle i sar., 2007). Utvrđeno je također da joni kadmija uzrokuju oksidativni stres, smanjuju stomalnu provodljivost kroz direktan uticaj na ćelije zatvaračice, smanjuju sadržaj pigmenata i gustinu hloroplasta u ćeliji. Joni kadmija direktno zaustavljaju proces fotosinteze oštećenjem tilakoidnih membrana u listovima čime narušavaju aktivnost glutacione sintetaze (Pietrini i sar., 2005). Smanjenje sadržaja pigmenata je direktno povezano sa inhibicijom sinteze hlorofila i karotenoida. Navodi se da kadmij utiče na smanjenje sadržaja Fe^{2+} i tako posredno izaziva hlorozu listova i opadanje intenziteta fotosinteze.

Ispitivanja uticaja dvije koncentracije jona Cd na sadržaj pigmenata hloroplasta kod hibridne topole (*P. Nigra* x *P. Maksimowitzii*) otkriveno je drastično povećanje sadržaja hlorofila pri višoj koncentraciji Cd, dok je pri nižoj koncentraciji Cd zabilježeno povećanje hlorofila b za 49% u tretiranim biljkama, kao i povećanje sadržaja karotenoida od 10% u odnosu na netretirane biljke (Nikolić i sar., 2008).

Također, varijacije u distribuciji fotosintetskih pigmenata dobivene su u zavisnosti od koncentracije tretmana jonima kadmija, olova i hroma, ali i među organima *Jatropha curcas* L (Chinmayee i sar., 2014). Autori su dobivene varijacije pripisali promjeni strukture hloroplasta pod uslovima djelovanja teških metala. Izmjerene su veće koncentracije hlorofila a i b kod biljaka tretiranih sa povećanom koncentracijom hroma, ali i manje koncentracije biljnih pigmenata u listovima i stabljikama biljaka tretiranih kadmijem. U istoj biljnoj vrsti kadmij i hrom su povećali sadržaj karotenoida u poređenju sa kontrolom (Chinmayee i sar., 2014). Teški metali inhibiraju biosintezu hlorofila i karotenoida, te ometaju uključivanje ovih pigmenata u fotosisteme. U navedenom istraživanju kadmij i olovo su izazvali redukciju skoro svih promatranih parametara osim karotenoida u oba ispitivana biljna organa, ali je primijećen i blagi porast pod tretmanom jonima hroma.

Djelovanjem jona teških metala, sadnice raži također pokazuju relativno povećanje degradacije sadržaja hlorofila a i b u odvojenim listovima (Krupa i sar., 1993). Melatonin može djelovati kao antioksidans protiv slobodnih radikala proizvedenih tokom fotosinteze biljaka. Veća degradacija melatonina se stoga može desiti u starijim listovima, koji sadrže veće količine hlorofila i veći stepen fotosinteze (Pothinuch i Tongchitpakdee, 2011).

Ispitujući uticaj egzogenog melatonina na starenje lista višegodišnje raži (*Lolium perenne* L.) u uslovima mraka, Zhang i saradnici (2016) našli su da listovi tretirani melatoninom dulje

zadržavaju zelenu boju u poređenju sa kontrolom pri osmodnevnom tretmanu. Isti je povećao koncentraciju endogenog melatonina, koji može direktno suzbiti starenje listova inducirano mrakom. Rast u uslovima bez svjetlosti značajno su povećali degradaciju hlorofila kao i fotohemijsku efikasnost u kontrolnim listovima. Međutim i sadržaj hlorofila i fotohemijska efikasnost bili su znatno poboljšani u listovima tetiranih melatoninom u odnosu na netretirane. Melatonin je rezultirao smanjenjem izražaja svih šest gena povezanih sa degradacijom hlorofila, kao i tri marker gena povezana sa starenjem lista raži (Zhang i sar., 2016).

Stres izazvan niskim temperaturama značajno smanjuje sadržaj fotosintetskih pigmenata u sadnicama pšenice. Sadržaj hlorofila i karotenoida je bio smanjen za 15 i 5,8%. Nasuprot tome, primjena egzogenog melatonina značajno ublažuje negativne efekte stresa izazvanog niskim temperaturama na fotosintetske pigmente, te osigurava daljnje povećanje sadržaja hlorofila i karotenoida za 15 i 14%. Također, sadržaj *Rubisco* enzima smanjen je u biljkama izloženim niskim temperaturama u trajanju od tri dana za oko 27% u odnosu na kontrolne biljke. Sa druge strane, izmjeren je povećan sadržaj *Rubisco* za 19% u biljkama pretretiranim melatoninom (Turk i sar., 2014).

U skladu sa našim istraživanjima Zhang i saradnici su dobili povećanje sadržaja hlorofila (u svježoj masi) tretiranjem uzoraka sa egzogenim melatoninom (Zhang i sar., 2012), dok su Wang i saradnici (2012) također pokazali da egzogena primjena melatonina usporava degradaciju hlorofila tokom starenja lista jabuke. Iste rezultate i efekat melatonina dobili su Arnao i Hernandez-Ruiz mjereći sadržaj hlorofila u listu ječma (Arnao i Hernandez-Ruiz, 2009). Dobiveni rezultati pripisani su u literaturi zaštitnoj ulozi melatonina protiv reaktivnih kisikovih vrsta, koje oštećuju (oksidiraju) hlorofile. Međutim, Lazar i saradnici (2013) dobili su nižu koncentraciju hlorofila, a taj naizgled kontradiktorni rezultat može biti objašnjen činjenicom da ROS ne oštećuju (oksidiraju) samo hlorofile, nego i druga jedinjenja (općenito proteine) fotosintetskog lanca prijenosa elektrona. Stoga, primjena egzogenog melatonina smanjuje oštećenja nastala djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta mnogih fotosintetskih jedinjenja (Lazar i sar., 2013).

Ispitan je funkcionalni značaj melatonina u bermudskoj travi (*Cynodon dactylon* L. Pers.), vrsti koja je od velike ekonomskog značaja, jer je kultivirana širom svijeta kao treset za travnjake, rekreacijske parkove i sportske terene. Pored zaštite trave od abiotičkog stresa melatonin ima blagotvorna metabolička djelovanja u ovoj biljci. Da bi se testirala sposobnost melatonina u savladavanju posljedica suše, biljke stare 21 dan su zalijevane vodom, ili rastvorom koji sadrži melatonin (4 μ M, 20 μ M ili 100 μ M) tokom sedam dana. Nakon toga,

neke biljke su još 21 dan bile podvrgnute suši, niskim temperaturama (4°C) ili visokom salinitetu (do 300 mM). U svakom procesu dodatak melatonina je poboljšao preživljavanje biljaka, a udio biljaka koje su preživjele koreliraju sa količinama melatonina u listovima biljke. Zalijevanje biljaka melatoninom također je povećalo sadržaj hlorofila, te visinu i biomasu. Biljke tretirane melatoninom su pokazivale povećanje 54 različita metabolita, koji su bili remećeni nametnutim stresovima. Na osnovu velikog broja korisnih efekata melatonina koji su mjereni u bermudskoj travi autori su također pretpostavili da melatonin ima veliki uticaj na metabolizam azota i ugljikohidrata (Shi i sar., 2015).

Sadržaj hlorofila ne samo da je očuvan melatoninom, već je održana, ili čak pojačana njegova fotosintetska djelotvornost. Prskanjem sadnica krastavaca rastvorom melatonina poboljšana je fotosinteza u biljkama održanim pod uvjetima sobne temperature, kao i kod biljaka izloženih visokim temperaturama. Zaključci su bazirani na većem sadržaju CO₂ u listu, koji ga čini dostupnim za sintezu ugljikohidrata (Xu i sar., 2010). Na temelju ovih ograničenih podataka može se pretpostaviti da smanjene količine melatonina u biljkama mogu ugroziti njihovu fiziologiju. Isto tako, svi pokazatelji su da viša u odnosu na normalnu koncentraciju melatonina u biljnim organima izgleda pomaže biljkama u smislu rasta i razvoja (Tan i sar., 2012).

Ovim radom dajemo korisne podatke za daljnja povezana istraživanja o samoj ulozi melatonina u ljekovitim biljkama. Međutim, uzimajući u obzir i dosadašnja istraživanja u kojima je prikazano kako je djelovanje melatonina u smislu poboljšanja rasta biljaka zavisno od njegove koncentracije i samog tkiva, potrebna su još mnoga istraživanja uključujući različite biljne vrste, kao i brojne razvojne faze, kako bi ustanovili njegovu optimalnu koncentraciju u poboljšanju biljne proizvodnje.

5.2.2.1. Analiza glavnih komponenti morfometrijskih i fizioloških parametara

Analiza glavnih komponenti (Hotelling, 1936), provedena na osnovu korelacijske matrice u koju su bile uključene srednje vrijednosti 12 kvantitativnih morfometrijskih i fizioloških parametara za 12 kombinacija modaliteta hemijskog spoja i biljne vrste, rezultirala je kreiranjem 12 sintetskih varijabli prikazanih u tabeli 16.

Tabela 16. Svojtvena vrijednost, udio varijanse i kumulativna varijansa povezana s prvih pet glavnih komponenti (PC), procijenjenih iz korelacijske matrice s 12 morfometrijskih i fizioloških varijabli kod 12 kombinacija modaliteta biljne vrste i hemijskog spoja

Varijable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Svojtvena vrijednost	6,44	2,77	1,55	0,80	0,24
Udio varijanse (%)	53,66	23,08	12,92	6,69	2,04
Kumulativna varijansa (%)	53,66	76,74	89,66	96,35	98,39

Analizom glavnih komponenti nad korelacijskom matricom sa 12 morfometrijskih i fizioloških, prvih pet glavnih komponenti sadržavalo je 98,39% ukupne varijanse sa pojedinim svojstvenim vrijednostima preko 0,24 (Tabela 17).

Tabela 17. Doprinos svakog od 12 analiziranih morfometrijskih i fizioloških svojstava u ukupnoj varijabilnosti eksperimenta (boldirani značajni izvori varijabilnosti).

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5
Visina biljke (cm)	0,3695	-0,0449	-0,2363	0,0068	0,0851
Prečnik biljke (cm)	0,2120	0,0522	-0,2076	0,8867	0,0269
Masa svježe biljke (g)	0,0438	0,5589	0,1866	0,1944	-0,2046
Masa suhe biljke (g)	0,3320	0,2528	-0,1717	-0,2642	-0,1292
Razvijenost korijena (cm)	0,3460	0,0926	-0,2111	-0,0626	0,7136
Masa svježeg korijena (g)	-0,2540	0,4401	0,1532	0,0268	0,1341
Masa svježe stabljike (g)	0,2818	0,3920	-0,1227	-0,1294	-0,2310
Masa suhog korijena (g)	-0,2089	0,4882	0,1177	-0,0236	0,2877
Masa suhe stabljike (g)	0,3660	0,0890	-0,1922	-0,2358	-0,2027
Hlorofil A (mg/g)	0,3213	-0,1018	0,4188	0,1383	-0,0213
Hlorofil B (mg/g)	0,2621	-0,0640	0,5681	-0,0869	0,3756
Karetinoidi (mg/g)	0,3054	-0,0483	0,4525	0,0438	-0,2958

Analizom dobijenih vrijednosti svojstvenih vektora identifikovana su svojstva sa najvećim doprinosom ukupnoj morfometrijskoj i fiziološkoj varijabilnosti matičnjaka i valerijane. Varijable sa najvećim svojstvenim vektorima u svakoj od glavnih komponenti su slijedeće:

- **PC1:** visina biljke, masa suhe biljke, masa suhe stabljike, karetinoidi;
- **PC2:** masa svježe biljke, masa svježeg korijena, masa svježe stabljike, masa suhog korijena;
- **PC3:** hlorofil A;
- **PC4:** prečnik biljke;
- **PC5:** razvijenost korijena, hlorofil B.

Sve posmatrane osobine su prisutne sa visokom vrijednošću u nekoj od prvih pet glavnih komponenti. Budući da je u prve dvije komponente pohranjeno više od 76% ukupne varijabilnosti eksperimenta, iste su detaljnije analizirane. Najznačajnija svojstva u prvoj glavnoj komponenti, koja nosi 53,66% ukupne varijabilnosti eksperimenta, su visina biljke, masa suhe biljke, masa suhe stabljike, karetinoidi.

Vrijednost od 23,08% ukupne varijabilnosti eksperimenta, koja je sadržana u drugoj glavnoj komponenti, najviše su doprinijele osobine masa svježeg korijena, masa svježeg stabljike, masa suhog korijena. Upotrebom glavnih komponenti (PC1 i PC2) kao prostornih dimenzija (ose x i y), konstruisan je set dvodimenzionalnih grafikona na kojima su predstavljeni međudnosi izvornih kvantitativnih osobina, kao i prostorna distribucija svih analiziranih kombinacija modaliteta oglednih faktora (grafikon 1 i 2), prikazani u prilogu ovog rada.

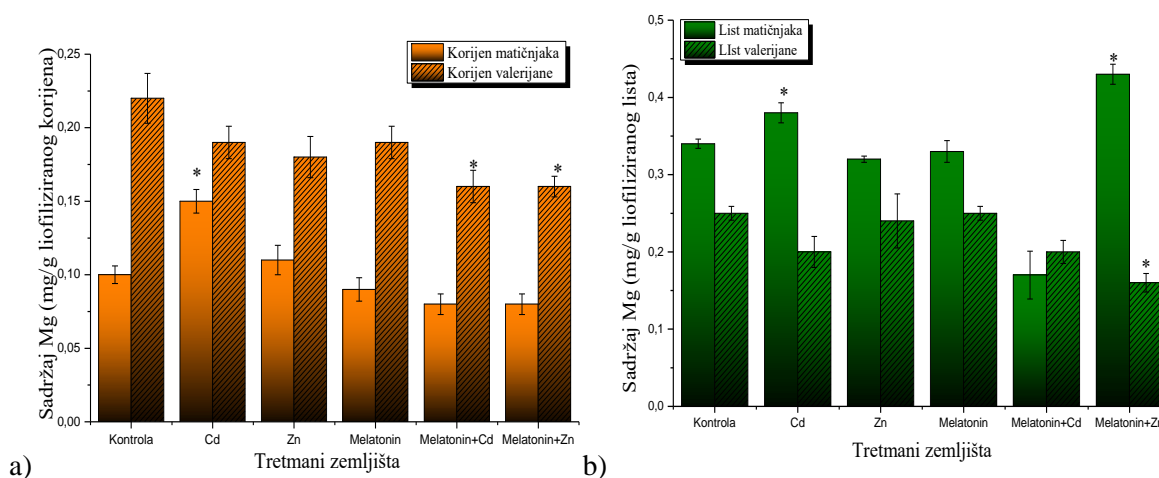
Na grafikonu 1 predstavljena su pojedina praćena svojstva prikazana u vidu vektora. Analizom glavnih komponenti određena je dužina vektora koja odražava ukupnu varijabilnost varijable koju dati vektor predstavlja. Dok se veći nivo varijabilnosti javlja kod veće dužine vektora, blizina pojedinih vektora odražava njihov nivo korelacije. Svojstva su u većoj korelaciji što su im vektori bliži. Grafikon 2 predstavlja razdvajanje analiziranih biljnih organa matičnjaka i valerijane na osnovu 12 kombinacija modaliteta biljne vrste i hemijskog spoja.

Grafikon 1 prikazuje postojanje pozitivne korelacije između osobina visina i prečnik biljke, razvijenost korijena, kao i hlorofila a, te karotenoida. Dobivena pozitivna korelacija može se objasniti činjenicom da se navedene osobine povećavaju proporcionalno sa rastom i razvojem biljke.

5.2.3. Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj makroelemenata u ispitivanim biljnim organima

U ovom radu, praćen je uticaj egzogenog melatonina, te Cd i Zn u zemljištu na sadržaj makroelemenata u listovima i korijenovima ispitivanih ljekovitih biljnih vrsta, neophodnih za njihov rast i razvoj, a prikazan je na slikama 35 i 36. Rezultati su pokazali prisustvo značajno veće koncentracije Mg i Ca sadržane u listu obje ljekovite vrste u odnosu na korijen.

Rezultati pokazuju statistički značajno povećanje sadržaja magnezija u korijenu matičnjaka tretiranog Cd (0,15 mg/g DW) i blago povećanje kod korijena biljaka tretiranih Zn (0,11 mg/g) u odnosu na kontrolne korijenove (0,10 mg/g DW) (slika 35a).

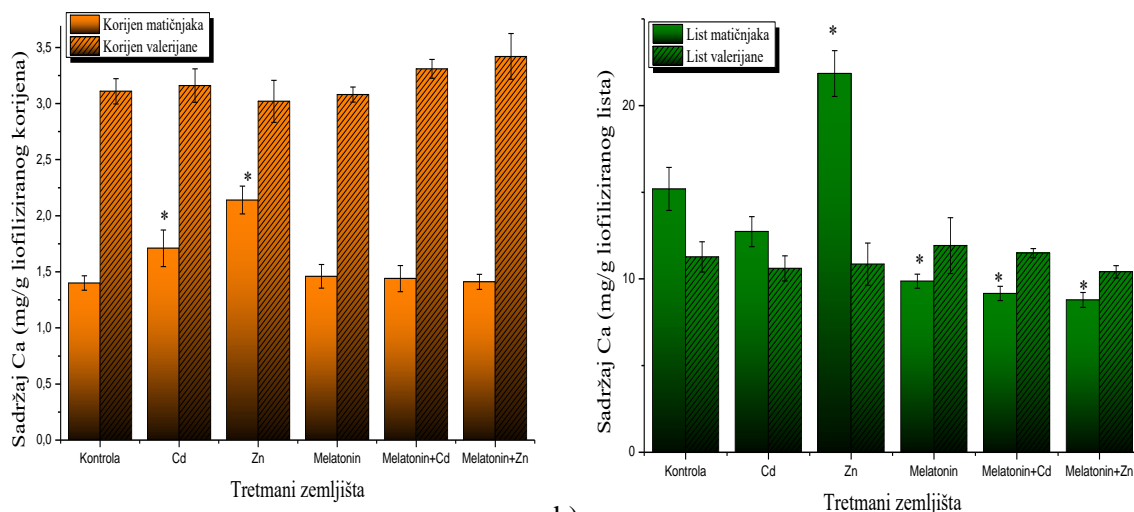


Slika 35. Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj Mg u a) korijenu i b) listu matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

Egzogeno tretiranje melatoninom nije uticalo na promjene koncentracije Mg u odnosu na kontrolu. Izostaje i značajna promjena sadržaja ovog makronutrijenta u korijenu melatoninom pretretiranih biljaka matičnjaka uz tretman teškim metalima. Rezultati također pokazuju da nema značajnijih promjena sadržaja Mg u listu matičnjaka tretiranog Cd (0,38 mg/g DW), Zn (0,32 mg/g DW), ni egzogenim melatoninom (0,33 mg/g DW) u odnosu na kontrolu (0,34 mg/g DW). Statistički vrlo značajno smanjenje koncentracije Mg u odnosu na kontrolu primijećeno je u listu matičnjaka tretiranog Cd uz egzogeni melatonin i iznosi 0,17 mg/g DW, ali i vrlo značajno povećanje u listu matičnjaka tretiranog Zn uz egzogeni melatonin, gdje koncentracija Mg iznosi 0,43 mg/g DW (slika 35b). Iako dolazi do blagog smanjenja koncentracije sadržaja Mg u korijenu i listu valerijane tretirane jonima teških metala, razlike nisu statistički značajne. Biljke pretretirane samo egzogenim melatoninom pokazuju istu koncentraciju Mg i u korijenu (0,19 mg/g DW) i listu (0,25 mg/g DW), pojedinačno, u odnosu na korijen (0,22 mg/g DW) i list kontrole (0,25 mg/g DW).

Statistički značajno smanjenje koncentracije magnezija javlja se u biljkama pretretiranim melatoninom uz tretman Cd (0,16 mg/g DW) i Zn (0,16 mg/g DW). Smanjenje se odnosi na oba analizirana biljna organa, u odnosu na kontrolu. U poređenju sa biljkama pretretiranim melatoninom u odsustvu teških metala nije došlo do značajnijeg smanjenja koncentracije ovog makronutrijenta.

Rezultati pokazuju veću koncentraciju Ca u korijenu valerijane (3,11 mg/g DW) u odnosu na korijen matičnjaka (1,40 mg/g DW). Međutim, u tretiranim korijenovima valerijane nije došlo do statistički značajnije promjene sadržaja ovog makronutrijenta (3,16 i 3,02 mg/g) (slika 36a).



a)

b)

Slika 36. Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj Ca u a) korijenu i b) listu matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

Tretman jonima Cd i Zn izaziva statistički značajno povećanje sadržaja kalcija u korijenu matičnjaka (1,71 i 2,14 mg/g DW u odnosu na kontrolu 1,40 mg/g DW). Sami pretretman egzogenim melatoninom (1,46 mg/g DW), ali i u kombinaciji sa jonima Cd i Zn nije uticao na promjenu u koncentraciji Ca u odnosu na kontrolu (1,44 i 1,41 mg/g DW, pojedinačno). U odnosu na kontrolne (15,19 mg/g), sadržaj Ca u listovima matičnjaka je značajno opadao u biljkama tretiranim kadmijem (12,73 mg/g) i značajno rastao u biljkama tretiranim cinkom, gdje se koncentracija ovog nutrijenta povećava do 21,85 mg/g (slika 36b). Egzogeni melatonin je ovaj put imao značajno inhibitorno djelovanje na sadržaj Ca u listovima ove biljne vrste (9,87 mg/g). Također, statistički značajno smanjenje koncentracije kalcija javlja se u biljkama matičnjaka pretretiranim melatoninom i tretiranim Cd (8,79 mg/g) i Zn (9,16 mg/g). Niti jedan tretman nije izazvao promjenu u sadržaju Ca u listovima valerijane (11,27 mg/g).

Kalcij zauzima središnju poziciju u ćelijskom prijenosu signala. Biljni signali za koje se smatra da prenosi Ca uključuju, između ostalih, dodir, vjetar, temperaturni šok, gljivice, oštećenja, oksidativni stres, anaerobnost, ABA, osmotski i mineralni stres. Krucijalna uloga Ca jona leži u regulaciji kompleksa koji razvija kisik u procesu fotosinteze. Povećanje koncentracije Cu ili Cd u okolišu dovodi do smanjenja sadržaja Ca u biljnim organima,

posebno listovima. Budući da je Ca nezamjenjiv u normalnom funkcionisanju fotosintetskog aparata, ne samo za fotosistem II nego i za Kalvinov ciklus, cijeli proces fotosinteze postaje manje efikasan pod ovakvim uslovima (Prasad, 2008). Nadalje, stepen oštećenja biljaka nastao interakcijom između teških metala i Ca uvelike ovisi o stadiju rasta biljke, gdje mladi listovi pokazuju manju osjetljivost.

Brojna istraživanja potvrđuju da je jedan od uzroka toksičnosti teškim metalima upravo sposobnost jona teških metala da zamijene neki od jona esencijalnih metala i da dovedu do izostanka metaboličke funkcije esencijalnih metala i do simptoma njihovog deficita, te poremećaja u mineralnoj ishrani biljaka. Unos teških metala zahtijeva proteinske nosače namijenjene za neki od esencijalnih metala kao što su kalcij i magnezij. Joni teških i esencijalnih metala pokazuju veliku sličnost u radijusu i naelektrisanju. Odnos naelektrisanja i veličine jona dodatno doprinosi lakoj zamjeni esencijalnih jona jonom teškog metala u strukturi proteina. Teški metali, kao što su joni Cd, imaju toliko slične hemijske osobine sa jonima Mg, koji je sastavni dio hema hlorofila, da može doći do zamjene ovog metala sa teškim metalom (Kupper i sar., 1998).

Mnogim istraživanjima je utvrđeno da teški metali utiču na usvajanje i metabolizam neophodnih elemenata. Tako, olovo, nikel i posebno kadmij inhibiraju ne samo usvajanje kalcija, magnezija, željeza, cinka, mangana i bakra, već i njihov transport iz korijena u nadzemne organe i utiču na raspodjelu elemenata u biljkama (Aller i sar., 1990).

Također, toksične koncentracije Zn u *Proteus vulgaris* rezultiraju inhibicijom fotosistema I i II, te za posljedicu rezultiraju smanjenjem intenziteta fotosinteze. Prikazano je da je mehanizam djelovanja ustvari zamjena Mg, jonima Zn na mjestu razdvajanja vode u fotosistemu II (Reichman, 2002).

U skladu sa našim istraživanjima, povećane koncentracije Cd povećale su sadržaj Mg i u *Aeluropus littoralis*. Povećanje je primijećeno kod manje koncentracije Cd (0-60 mg Cd/kg zemljišta), dok je pri njegovim višim koncentracijama (120-240 mg Cd/kg zemljišta) Mg značajno reduciran. U istom istraživanju dobivene su veće koncentracije Zn u kontroli nego u tretmanima. Sadržaj Zn u izbojcima je značajno smanjen pri tretmanu jonima Cd od 15 do 240 mg/kg zemljišta (Rezvani i sar., 2011).

Također, istražen je uticaj tri različite koncentracije Cd na mineralni sastav šest biljnih vrsta sa različitom tolerancijom na Cd (grah, grašak, riža, kukuruz, krastavac i bundeva). Rezultati su pokazali smanjen sadržaj kalija u grahu i grašku i mangana u kukuruzu. Sadržaj bakra je povećan u korijenovima svih ispitivanih biljnih vrsta. Međutim, kalcij, magnezij i cink nisu

pokazali nikakvu jasnu tendenciju na primjenu Cd niti u jednoj biljnoj vrsti (Obata i Umebayashi, 1997).

Za razliku od našeg istraživanja, povećane koncentracije teških metala, Pb, Cd i Zn, rezultirale su značajnim smanjenjem koncentracije natrija, kalija, kalcija, željeza, magnezija i mangana u špinatu, *Spinacia oleracea*. Uticaj pomenutih teških metala zavisio je od njihove koncentracije u biljnom tkivu (Alia i sar., 2015).

Smanjenje intenziteta usvajanja i transporta neophodnih mineralnih elemenata zavisi, pored ostalog, i od koncentracije neesencijalnih metala u supstratu, vrste neophodnog mineralnog elementa, biljne vrste, genotipa i dr. Od simptoma deficita ovih esencijalnih metala pojavljuju se hloroze i nekroze listova (Yang i sar., 1996).

Pri izraženom višku jona nikla i kadmija u hranljivoj podlozi kod brojnih biljnih vrsta se potpuno inhibira metabolizam magnezija, željeza, mangana i cinka, a kao posljedica toga uočava se njihov nedostatak u mladim, novoformiranim nadzemnim organima. Ispitivani teški metali su imali najviše uticaja na koncentraciju alkalnih i zemnoalkalnih metala, posebno magnezija (Kastori i Vapa, 1994). Suprotno pomenutim autorima, Yang i saradnici (1996) su u većem broju biljnih vrsta utvrdili da kadmij povoljno utiče na usvajanje i transport fosfora i posebno sumpora.

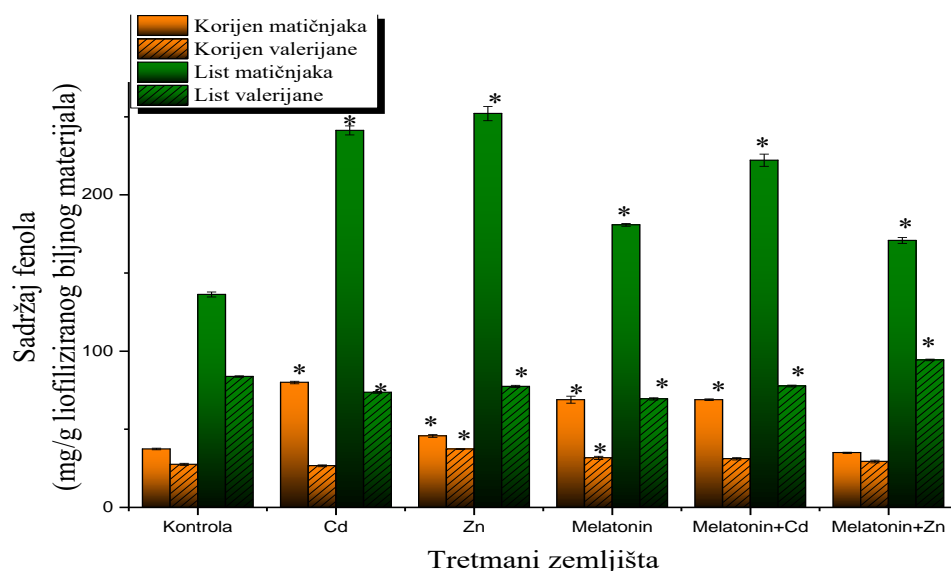
5.2.4. Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj fenola i flavonoida u ispitivanim biljnim organima

Fenolna jedinjenja, sa najvažnijom klasom flavonoida, zbog svojih hemijskih osobina predstavljaju glavne nosioce antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih rastvorljivih fenola u etanolnim ekstraktima korijena i lista matičnjaka i valerijane, kontrolnim i tretiranim prikazani su na slici 37.

Sadržaj fenolnih jedinjenja u korijenu matičnjaka kretao se u rasponu od 38 do 80 mg/g liofiliziranog biljnog materijala, dok su se u listovima matičnjaka vrijednosti ukupnih fenolnih jedinjenja kretale u rasponu od 136 do 253 mg/g liofiliziranog lista. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u listovima je tri do šest puta veći nego u korijenovima.

Primjenom Tuckey testa jasno se uočavaju razlike u sadržaju ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima korijena matičnjaka u svim tretmanima. Djelovanjem Cd i Zn može se primijetiti statistički vrlo značajan porast sadržaja ukupnih fenola u odnosu na netretirane biljke (79,93 i 45,68 mg/g). Egzogeno primjena melatonina također je izazvala povećanje sadržaja ukupnih

fenola u odnosu na kontrolu (2 puta veći sadržaj, 68,9 mg/g). Melatoninom pretretirane biljke u Cd i Zn onečišćenom zemljištu pokazuju statistički značajno veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na kontrolne biljke, međutim njihov sadržaj je značajno manji prema biljkama tretiranim teškim metalima u kojima egzogeni melatonin nije primijenjen (68,89 i 34,99 mg/g).



Slika 37. Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj fenola u organima matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

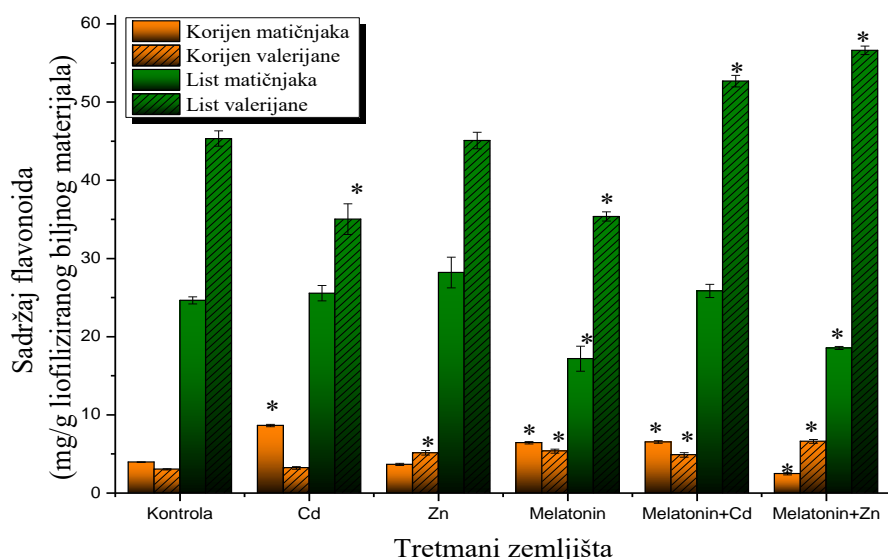
Iako list matičnjaka pokazuje znatno veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, rezultati pokazuju njihov isti odnos stimulacije u svim primijenjenim tretmanima. Oba teška metala, egzogeni melatonin, kao i egzogeni melatonin u kombinaciji sa teškim metalima uticala su na povećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja.

Sadržaj fenolnih jedinjenja u korijenu valerijane kretao se u rasponu od 26 do 37 mg/g liofiliziranog korijena, dok su te vrijednosti u listovima od 70 do 95 mg/g liofiliziranog lista. Tretman valerijane jonima Cd djelovao je inhibirajuće na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u korijenu ove biljke, iako smanjenje nije statistički značajno (26,58 mg/g). Za razliku od Cd, Zn je djelovao stimulatивно i uticao na značajno povećanje sadržaja ukupnih fenola (37,31 mg/g). Skoro dva puta veću koncentraciju ukupnih fenola pokazale su biljke pretretirane melatoninom, u odnosu na kontrolne. Za razliku od rezultata dobijenih u korijenu matičnjaka pretretman melatoninom je imao stimulatивно djelovanje na povećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u korijenu valerijane, biljkama raslim na metalima onečišćenom zemljištu, u poređenju sa kontrolom. Međutim, promatrano povećanje nije bilo statistički značajno djelovanjem jona Zn (28,36 mg/g).

Tretmani su izazvali različito ponašanje u listovima valerijane. Naime, pod uticajem jona Cd i Zn, kao i u biljkama pretretiranim melatoninom, te melatoninom i jonima Cd došlo je do statistički značajnog smanjenja sadržaja fenola u odnosu na kontrolne listove. Biljke pretretirane melatoninom i uzgajane na cinkom onečišćenom zemljištu pokazuju značajno povećanje sadržaja ukupnih fenola (94,36 mg/g). Varijacije sadržaja fenolnih jedinjenja biljaka su posljedica djelovanja velikog broja faktora, koji pored genetičkih, uključuju i područje kultivacije kao i mnogobrojne faktore životne sredine (Dorman i sar., 2003).

Dokazano je da fenolna jedinjenja imaju vrlo važnu ulogu u povećanju tolerancije biljke na različite abiotičke uzročnike stresa (temperaturne razlike, prisustvo teških metala i pesticida, vodeni deficit, UV zračenje, salinitet, izloženost ozonu) i biotičke uzročnike stresa (biljojedi, patogeni, virusi), koji posljedično izazivaju povišenje nivoa fenolnih jedinjenja u vegetativnim izbojcima i korijenovima (Chalker-Scott, 2002). Zbog svoje specifične hemijske strukture, velikom broju elektron-donorskih hidroksilnih grupa i sposobnosti rezonancije elektrona, fenolna jedinjenja sposobna su da vrše redukciju skoro svih reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta. Matičnjak i valerijana su ljekovite biljke vrlo bogate fenolnim spojevima i visokom antioksidativnom aktivnošću.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije flavonoida u etanolnim ekstraktima korijena i lista matičnjaka i valerijane, kontrolnim i tretiranim prikazani su na slici 38.



Slika 38. Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj flavonoida u organima matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

Sadržaj flavonoida u korijenu matičnjaka kretao se u rasponu od 2,5 do 9 mg/g liofiliziranog biljnog materijala, dok je sadržaj u listovima matičnjaka od 17 do 29 mg/g liofiliziranog lista.

List matičnjaka i u ovom slučaju pokazuje tri do sedam puta veću koncentraciju flavonoida u odnosu na njegov korijen.

Joni Cd u korijenu matičnjaka doprinijeli su porastu koncentracije flavonoida u poređenju sa kontrolnim, netretiranim biljkama, za dvostruku vrijednost (8,63 mg/g). Isto stimulatívno djelovanje Cd javlja se u biljkama pretretiranim egzogenim melatoninom (6,53 mg/g). Zn je, sa druge strane, djelovao inhibirajuće na sadržaj flavonoida u biljkama sa i bez egzogeniog melatonina (2,47 i 3,66 mg/g). Kod tretmana biljaka samim melatoninom primjećuje se značajan porast sadržaja flavonoida u odnosu na netretirane biljke (6,44 mg/g). Povećanje koncentracije je statistički značajno.

Potpuno drugačiji rezultati dobijeni su u listu matičnjaka. Joni teških metala doprinijeli su blagom porastu koncentracije flavonoida (25,56 mg/g) u poređenju sa netretiranim biljkama (24,65 mg/g), ali povećanje nije statistički značajno. Tretmani sa egzogenim melatoninom, melatoninom i Zn izazvali su značajno smanjenje sadržaja flavonoida (17,17 i 18,55 mg/g), dok u biljkama tretiranim melatoninom u zemljištu onečišćenom Cd nije došlo do promjene.

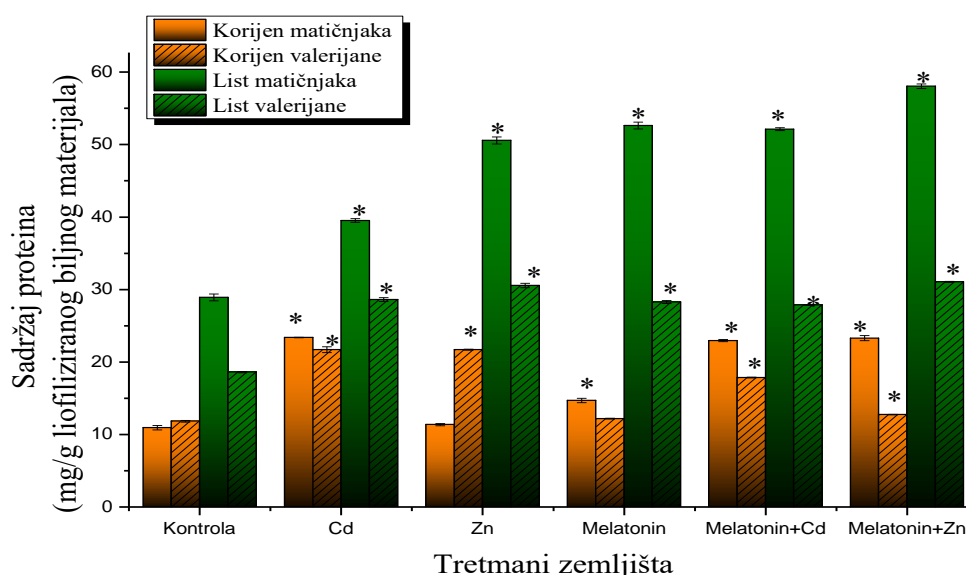
Koncentracija flavonoida u korijenu valerijane kretao se u rasponu od 3 do 6,6 mg/g liofiliziranog biljnog materijala, a u listovima valerijane od 35 do 57 mg/g liofiliziranog lista. List valerijane pokazuje sedam do čak petnaest puta veću koncentraciju flavonoida u odnosu na korijen. Statistički značajno povećanje koncentracije flavonoida u korijenu valerijane javlja se u svim tretmanima izuzev tretmanom jonima Cd, koji je djelovao samo blago stimulatívno (3,25 mg/g).

Listovi valerijane pretretirane egzogenim melatoninom, kao i oni tretirani samo jonima Cd pokazuju značajno smanjenje koncentracije flavonoida (35,37 i 35,03 mg/g) u odnosu na listove kontrolnih biljaka (45,34 mg/g). Zn nije imao uticaja na promjene u sadržaju flavonoida. Interesantno je značajno povećanje koncentracije flavonoida u listovima valerijane pretretirane egzogenim melatoninom pri kontaminaciji zemljišta jonima Cd (52,69 mg/g) i Zn (56,62 mg/g). Dokazano je da melatonin ima mnoge fiziološke funkcije u biljkama, a najviše istražena funkcija je prevencija oksidativnog oštećenja uzrokovanog različitim abiotičkim stresorima poput saliniteta (Li i sar., 2017), niskih temperatura (Balabusta i sar., 2016) i toksičnog djelovanja kadmija (Hasan i sar., 2015). Predlaže se da bi se melatonin trebao klasificirati kao antioksidans koji djeluje u mitohondriji, budući da postiže svoj antioksidativni kapacitet direktnom detoksikacijom reaktivnih kisikovih i reaktivnih dušikovih vrsta i indirektno stimulira antioksidativne enzime, suzbijajući aktivnost prooksidativnih enzima (Zhang i sar., 2014).

U skladu sa našim istraživanjem, ranije je ispitivan uticaj melatonina na sadržaj fenolnih jedinjenja u bobičastom voću (Xu i sar., 2018). Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i proantocijanida postepeno je poboljššan sa zrenjem voća sa maksimumom 77 dana u voćnoj kori. Nasuprot tome, ispitivani parametri su imali niske vrijednosti u pulpi. U poređenju sa pomenutim kontrolnim biljkama, tretman melatoninom je općenito statistički značajno poboljšao sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i proantocijanida (Xu i sar., 2018). Također, 15 μ M melatonin stimulatивно djeluje na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida kod sadnica gorke naranče, *Citrus aurantium* L. (Sarrou i sar., 2015). Rezultati pokazuju povećanje od skoro dva puta u odnosu na kontrolne, netretirane biljke.

5.2.5. Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj solubilnih proteina i aktivnost antioksidativnih enzima u ispitivanim biljnim organima

Prikazano je da usljed izloženosti teškim metalima dolazi do promjena u sadržaju proteina, a vrlo vjerovatno je da neki od tih proteina imaju i katalitičku funkciju. Teški metali izazivaju i promjene katalitičke aktivnosti enzima zahvaljujući velikom afinitetu vezivanja za sulfhidrilne ili neke druge grupe iz njihovog aktivnog centra, što dovodi do smanjenja aktivnosti ili potpune inhibicije (Schutzendubel i Pole, 2002).



Slika 39. Uticaj melatonina i teških metala na sadržaj proteina u organima matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

Na slici 39 predstavljeni su rezultati određivanja koncentracije solubilnih proteina u listovima i korijenovima matičnjaka i valerijane za sve primijenjene tretmane. Ispitivanje uticaja teških metala i egzogenog melatonina na sadržaj solubilnih proteina pokazuje da prilikom izlaganja jonima kadmija dolazi do značajnog povećanja sadržaja proteina u korijenu matičnjaka (23,38 mg/g) u odnosu na kontrolu (10,85 mg/g). Slično povećanje javlja se i tretmanom egzogenim melatoninom (14,70 mg/g), kao i melatonina sa jonima kadmija (22,95 mg/g), te posebno cinka (23,29 mg/g). Korijen matičnjaka uzgajanog na zemljištu onečišćenog cinkom nije uticao na promjenu sadržaja solubilnih proteina, u odnosu na kontrolu (11,36 mg/g).

List matičnjaka pokazuje do tri puta veću koncentraciju solubilnih proteina u odnosu na korijen. Također, u listu dolazi do povećanja sadržaja proteina kod svih tretmana, u odnosu na kontrolne listove (28,93 mg/g). Najznačajnije, čak dvostruko, povećanje javlja se u listovima biljaka pretretiranih egzogenim melatoninom (53,52 mg/g). Listovi biljaka pretretiranih melatoninom uzgajanih na zemljištu kontaminiranom kadmijem i cinkom također pokazuju značajno povećanje koncentracije solubilnih proteina (52,13 i 57,96 mg/g), u odnosu na listove kontrolnih biljaka (28,86 mg/g).

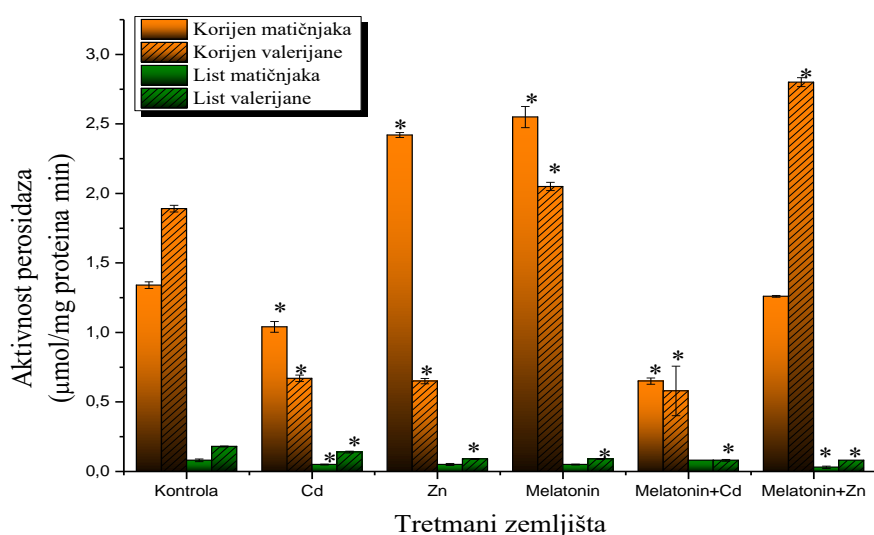
Povećan sadržaj solubilnih proteina uočava se i u korijenu valerijane kod biljaka tretiranih jonima Cd (21,70 mg/g) i Zn (21,70 mg/g) u odnosu na kontrolu (11,76 mg/g). Pretretman melatoninom je blago povećao sadržaj proteina u korijenu valerijane, ali povećanje nije statistički značajno. Međutim, pretretman melatoninom uz jone kadmija utiče na značajno povećanje sadržaja proteina u korijenu valerijane. Zn uz melatonin nije imao isti efekat. U listu valerijane, sa druge strane, kod svih šest tretmana uočava se statistički značano povećane sadržaja solubilnih proteina, u odnosu na kontrolne.

U skladu sa našim rezultatima su i rezultati da se količina solubilnih proteina značajno povećava u listovima pšenice, podvrgnutih niskim temperaturama. Dobiveno je povećanje sadržaja solubilnih proteina za oko 12%. Primjena egzogenog melatonina rezultirala je još većim sadržajem solubilnih proteina od čak 20%. Profil proteina određen SDS-PAGE (natrijum dodecil sulfat-elektroforeza na poliakrilamidnom gelu) ukazuje na poboljšani sadržaj solubilnih proteina u uslovima stresa izazvaog niskim temperaturama. Niske temperature stimulirale su sadržaj nekih proteina sa djelomično niskom molekulskom masom, između 7 i 46 kD, dok je primjena egzogenog melatonina povećala sadržaj mnogih proteina sa niskim i visokim molekulskim masama (Turk i sar., 2014).

Od 12 do najmanje 96 h poslije tretmana visokim koncentracijama Zn, korijen tolerantnog kultivara trave *Festuca rubra* imao je veći sadržaj proteina u mitotičkim ćelijama u poređenju sa kontrolom, dok je osjetljivi kultivar imao niži sadržaj proteina (Davies i sar., 1991).

Povećanje kod tolerantnog kultivara može se javiti zbog proizvodnje proteina stresa koji štite biljku. Nasuprot tome, smanjenje kod osjetljivog kultivara je vjerovatno rezultat toksičnog djelovanja na ćelijski metabolizam.

Kako bi savladale toksičnost teškim metalima biljne ćelije su opskrbljene sa enzimatskim mehanizmima pomoću kojih eliminišu ili reduciraju njihovo štetno djelovanje. Peroksidaze, kao i askorbat peroksidaze štite ćelije protiv štetnog oksidativnog djelovanja H_2O_2 .



Slika 40. Uticaj melatonina i teških metala na aktivnost peroksidaza u matičnjaku i valerijani.

Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

Praćenjem aktivnosti peroksidaza u biljkama u uslovima opterećenosti zemljišta jonima kadmija dolazi do opadanja aktivnosti ovog enzima u korijenu i listu obje ispitivane biljne vrste (Hodžić i sar., 2018).

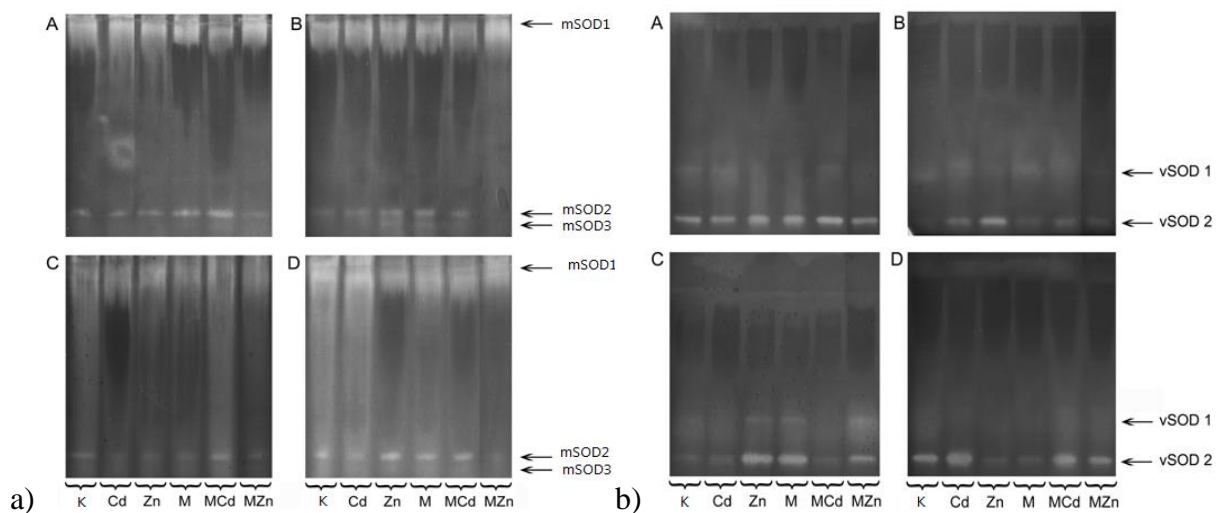
Najveće smanjenje aktivnosti peroksidaza primijećen je u korijenu valerijane tretirane jonima Cd ($0,67 \mu\text{mol mg}_{\text{proteina}}^{-1} \text{min}^{-1}$) u odnosu na kontrolu ($1,89 \mu\text{mol mg}_{\text{proteina}}^{-1} \text{min}^{-1}$), gdje se aktivnost smanjila za skoro tri puta.

Pod uticajem jona cinka, aktivnost peroksidaza povećala se samo u korijenu matičnjaka ($2,39 \mu\text{mol mg}_{\text{proteina}}^{-1} \text{min}^{-1}$) i to za dvostruku vrijednost u odnosu na korijen netretiranih biljaka ($1,35 \mu\text{mol mg}_{\text{proteina}}^{-1} \text{min}^{-1}$), dok je u korijenu valerijane i u listovima obje biljne vrste aktivnost opadala. Do povećanja aktivnosti peroksidaza došlo je u korijenovima obje biljne vrste pretretirane egzogenim melatoninom ($2,55 \mu\text{mol mg}_{\text{proteina}}^{-1} \text{min}^{-1}$ za matičnjak i $2,05 \mu\text{mol mg}_{\text{proteina}}^{-1} \text{min}^{-1}$ valerijanu). Međutim, u listovima i matičnjaka i valerijane se javlja suprotno djelovanje egzogenog melatonina, gdje se skoro za dvostruku vrijednost primjećuje smanjenje aktivnosti ($0,08 \mu\text{mol mg}_{\text{proteina}}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Najniža aktivnost peroksidaza izmjerena je u korijenovima i listovima obje biljne vrste pretretirane melatoninom i uzgajane na zemljištu onečišćenom jonima kadmija. Iako je objavljeno da melatonin utiče na povećanje aktivnosti mnogih antioksidativnih enzima (Wang i sar., 2012) u uvjetima oksidativnog stresa u našem slučaju nije došlo do povećanja aktivnosti peroksidaza u listovima obje biljne vrste. Moguće je da se odbrambena aktivnost peroksidaza bazira na zaštiti biljaka u korijenu, gdje se i uočava statistički značajno povećanje aktivnosti enzima. Također, primjenjena koncentracija jona kadmija nije mogla djelovati toliko toksično za ove vrlo otporne biljne vrste. Aktivnost enzima u listovima obje biljne vrste je smanjena u svim primjenjenim tretmanima u odnosu na netretirane biljke.

Općenito, najznačajnije povećanje aktivnosti peroksidaza javlja se u korijenu valerijane pretretirane egzogenim melatoninom, biljkama uzgajanim na zemljištu onečišćenom jonima cinka ($2,80 \mu\text{mol mg}_{\text{proteina}}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Uzimajući u obzir činjenicu da SOD predstavlja prvu liniju odbrane biljne ćelije protiv oksidativnog stresa određene su SOD izoforme i aktivnost u listu matičnjaka i valerijane, predstavljene na slikama 41 i 42. Prema dobijenim rezultatima listovi matičnjaka pokazuju prisustvo tri SOD izoforme, označene kao mSOD1 ($R_f=0,117$), mSOD2 ($R_f=0,834$) i mSOD3 ($R_f=0,886$).



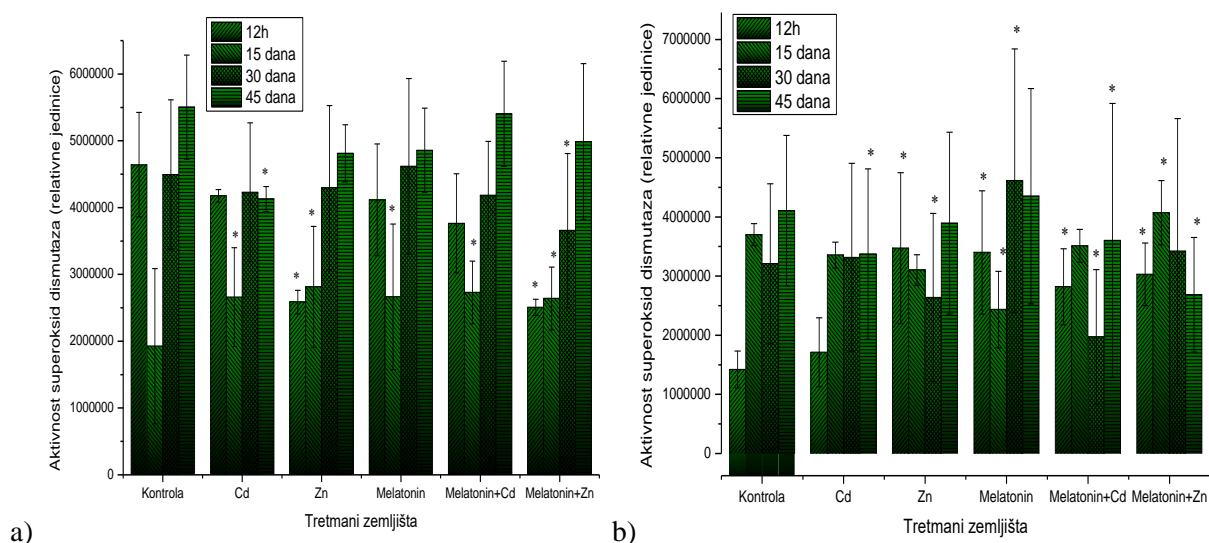
Slika 41. Nativna elektroforeza (8% gel) sa razdvojenim SOD izoformama u listu a) matičnjaka i b) valerijane 12h(A), 15 dana (B), 30 dana (C) i 45 dana (D) nakon tretmana teškim metalima. (K-kontrola, M-melatonin, m-matičnjak, v-valerijana)

U kontrolnim, ali i svim tretiranim listovima detektovana je mSOD1 izoforma, koja je moguće specifična za ovu ljekovitu biljnu vrstu. U svim fazama rasta i u svim tretmanima uočena je mSOD2 izoforma. U listovima matičnjaka 12h nakon tretmana teškim metalima,

samo je tretman kadmijem uz pretretman melatoninom indukovao formiranje nove izoforme (mSOD3), koja se u kasnijim fazama razvoja ne uočava. Također, tretman cinkom u listovima matičnjaka pretretiranih melatoninom pomenuta izoforma se uočava 15 dana nakon tretmana metalima. Pretpostavka je da se indukcija mSOD3 izoforme javlja ovisno o fazi razvoja biljke, kao i tretmana.

U listovima valerijane razdvojene su dvije SOD izoforme, označene kao vSOD1 ($R_f=0,640$) i vSOD2 ($R_f=0,856$). Izoforma vSOD2 detektovana je u svim fazama razvoja kontrolnih i svih tretiranih listova valerijane. Sa druge strane, vSOD1 izoforma detektovana je u svim fazama razvoja samo u kontrolnim listovima valerijane, a njena indukcija i inhibicija ovisi o primijenjenom tretmanu i fazi razvoja biljke.

Rezultati našeg istraživanja su pokazala značajne razlike u aktivnosti SOD listova matičnjaka 12h nakon tretmana sa Zn ali i Zn uz pretretman melatoninom, gdje se uočava inhibicija aktivnosti. Također, slična pojava uočava se u listovima tretiranih sa Cd, te sa Cd uz pretretman melatoninom (slika 42a).



Slika 42. Uticaj melatonina i teških metala na aktivnost SOD u organima a) matičnjaka i b) valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

Tokom razvoja, značajno je smanjena SOD aktivnost u kontrolnim listovima matičnjaka 15 dana nakon tretmana i značajno povećana 45 dana nakon tretmana metalima. U svim tretmanima najznačajnija promjena u SOD aktivnosti javlja se 45 dana nakon tretmana. Poređenjem dobivenih rezultata aktivnosti SOD sa sadržajem proteina u različitim periodima nakon tretmana očigledno je da je akumulacija proteina prva odbrambena reakcija protiv

vanjskog stresa, nakon čega enzimski antioksidativni sistem preuzima kontrolu, što ukazuje na činjenicu da biljka ima svlo specifičan odbrambeni sistem.

U listovima valerijane uočava se značajan porast aktivnosti SOD u svim tretmanima u odnosu na kontrolu 12h nakon tretiranja teškim metalima. Nasuprot tome, u svim tretmanima aktivnost SOD je inhibirana 15 dana nakon tretmana u odnosu na kontrolu, ali je samo u listovima pretretiranih melatoninom smanjenje značajno. Opet, dobiveni rezultati ukazuju da SOD ativnost moguće ovisi o vremenu uzorkovanja, ali i pretretamanu melatoninom. Male razlike u SOD aktivnosti javljaju se u listovima tretiranih biljaka valerijane u odnosu na kontrolu 30 dana nakon tretmana, ali se značajno smanjenje aktivnosti javlja u biljkama pretretiranih melatoninom uz tretman teškim metalima u odnosu na sami pretretman melatoninom. Konačno, biljke pretretirane melatoninom pokazuju bolji odbrambeni odgovor 12h, kao i 30, te 45 dana od tretmana sa Cd i Zn. Ispitivane biljne vrste pokazuju različite promjene, pri čemu se u listovima matičnjaka javlja povećana SOD aktivnost sa maksimumom pri završnom razvojnem periodu. Sa druge strane, aktivnost SOD smanjena je u listovima valerijane pretretiranih melatoninom uz tretman cinkom u završnoj fazi razvoja.

Ranije je prikazano da tretman melatoninom značajno poboljšava aktivnost SOD, a samim tim i sposobnost neutralisanja ROS u listovima pšenice tretirane sa nano-ZnO (Zuo i sar., 2017).

Prikazano je da višak cinka stimulira proizvodnju nekoliko enzima u *P. Vulgaris*. Autori su predložili da ova pojava može biti kompenzacija ćelije za inhibiciju fizioloških aktivnosti uzrokovanih cinkom, poput inhibicije proizvodnje NADPH u hloroplastima. Ubrzana je i proizvodnja slobodnih radikala u biljkama izloženih višku Zn (Prasad i sar., 1999). U pokušaju neutralizacije toksičnih efekata visokog sadržaja kisika, povećavaju se specifične aktivnosti superoksid dismutaza, katalaza, gvajakol i askorbat peroksidaza, mono i dehidroaskorbat reduktaza, te glutation reduktaza (Prasad i sar., 1999). Kod riže, *Oryza Sativa*, visoke koncentracije Zn povećavaju aktivnost peroksidaza, auksin oksidaza i oksidaza askorbinske kiseline, ali i smanjuju aktivnost katalaza, α -amilaza i ATPaza (Nag i sar., 1984). Također, prikazano je da giberelinska kiselina u istoj biljnoj vrsti ima zaštitnu ulogu protiv toksičnosti cinkom, pod pretpostavkom da to može biti povezano sa djelovanju kiseline na poboljšanje sinteze enzimskih proteina. Autori pretpostavljaju da je cink u mogućnosti, iako ne u potpunosti, zamijeniti Mg kao kofaktor za enzim (Reichman, 2002).

U skladu sa nižom enzimskom aktivnošću dobivenom za istraživane biljne ljekovite vrste (Slika 42), smanjenje enzimske aktivnosti katalaza i superoksid dismutaza povezano je sa

toksičnim djelovanjem kadmija kod graha, *Phaseolus vulgaris* (Chaoui i sar., 1997), graška, *Pisum sativum* (Sandalio i sar., 2001) i mnogih drugih biljnih vrsta. Smanjenje aktivnosti peroksidaza uzrokovano kadmijem objavljeno je za senf (*Brassica juncea*) (Tran i Popova, 2013).

Tabela 18. Pregled radova o modifikaciji aktivnosti antioksidativnih enzima kod različitih vrsta biljaka usljed primjene melatonina (Hodžić i sar., 2019)

Biljna vrsta	Tretman melatonin	Tretman stres	Promjene u antioksidativnom metabolizmu				Ref.
			SOD	POD	CAT	APX	
<i>Pšenica</i>	1mM melatonin	Hladnoća (3 dana)	Povećan	-	Nepromijenjen	-	Turk i sar., 2014
<i>Divlja jabuka</i>	0,1 µM	100mM NaCl 15dana	-	Povećan	Povećan	Povećan	Li i sar., 2012
<i>Paradajz</i>	50 µM melatonin (2h)	22 °C sa 75% vlažnošću uz 16h svjetlo/8 h mrak	-	Povećan	Povećan	-	Sun i sar., 2016
<i>Engleski ljulj</i>	20, 50 i 100 µM	Mrak	Povećan	-	Povećan	Smanjen	Zhang i sar., 2016
<i>Divlja jabuka</i>	5 µM	pH 8.5 - 8.8 (15 dana)	Isti	Isti	Povećan	-	Gong i sar., 2017
<i>Krastavac</i>	50–150 µM	200 mM NaCl	Povećan	Povećan	Povećan	Povećan	Wang i sar., 2016
<i>Pšenica</i>	1mM melatonin	nano-ZnO stres ZnO NPs 300 mg/L	Povećan	-	Povećan	Povećan	Zuo i sar., 2017
<i>Sitnocvjetna konica</i>	50, 100, 150, 200 µM	Cd, 10 mg (40 dana)	Povećan	Povećan	Povećan	-	Tang i sar., 2017

Hloroplasti i mitohondrije su glavni izvor proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta u biljnim ćelijama budući da fotosintetski i respiratorni procesi proizvode ROS. Istraživanja o interakciji melatonina sa mehanizmima signaliziranja stresa identificirala su kompleksnu vezu sa ROS. Rezultati pokazuju da je melatonin antioksidans širokog spektra djelovanja i može ukloniti ROS visokom efikasnošću. Tretmani melatoninom moduliraju antioksidativne enzime povećavajući nivoe transkripcije i aktivnosti. Nivoi transkripcije gena, SOD, APX, CAT i POD su također povećani melatoninom (Rodriguez i sar., 2004). Tretman melatoninom vodi do održavanja viših količina askorbinske kiseline i glutation disulfida (GSH) reduktaze

(Wang i sar., 2012). Teorija da dodatak melatonina smanjuje oksidativnu štetu uzrokovanu stresom direktnim uklanjanjem ROS i poboljšavajući antioksidanse, te aktivnost antioksidativnih enzima potvrđena je u mnogim eksperimentima. Melatonin usput mijenja ekspresiju gena koji učestvuju u prijenosu signala (Zhang i sar., 2014).

Egzogeni melatonin smanjuje štetu nastalu djelovanjem mraka na listove višegodišnje raži pojačavajući uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta regulirajući aktivnosti SOD i CAT. Prema tome, melatonin može dati različit odgovor u uklanjanju slobodnih radikala u različitim biljnim vrstama, posebno mono- i dikotiledona (Zhang i sar., 2016). Nedovoljan je broj radova i još uvijek su djelimični rezultati o uticaju egzogeno dodanog melatonina na modifikaciju enzimske aktivnosti. Pregled važnijih istraživanja predstavljen je u tabeli 18.

5.2.6. Uticaj melatonina i teših metala na antioksidativnu aktivnost ekstrakata ispitivanih biljnih organa

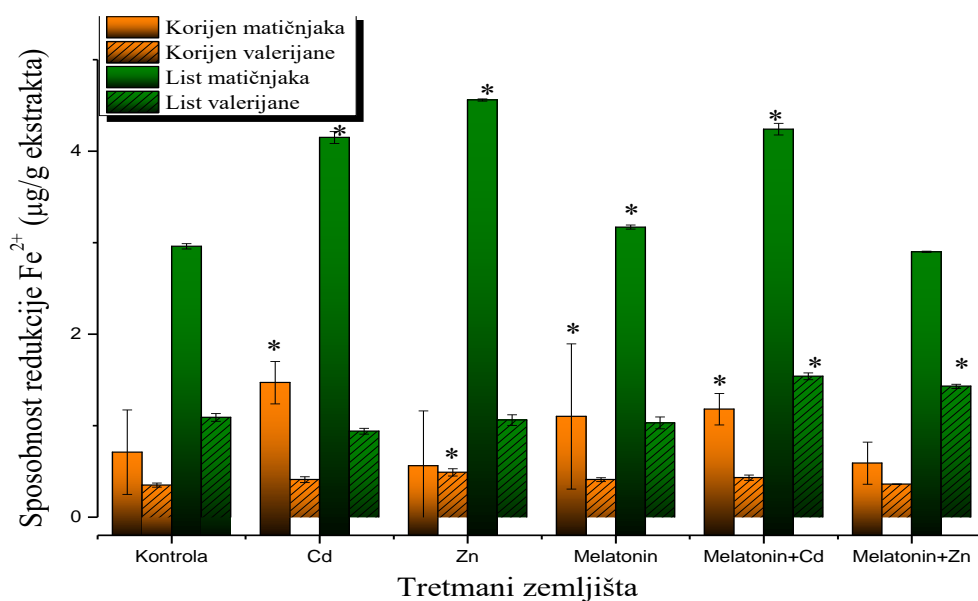
Mnoga istraživanja ukazuju na značaj oksidativnog stresa u razvoju degenerativnih bolesti, zbog čega postoji interes za određivanjem antioksidativnih jedinjenja iz ljekovitih biljaka. Značaj jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima potiče i od njihove sposobnosti da štite druge biomolekule od štetnog djelovanja kisika. Jedinstvenog mjerila antioksidativne aktivnosti nema, jer ova jedinjenja djeluju različitim mehanizmima (inhibicijom oksidativnih enzima, vezivanja jona prelaznih metala itd.).

U radu je urađena serija biohemijskih testova kojima je cilj mjerenje sposobnosti ekstrakata da vrše neutralizaciju slobodnih radikalskih vrsta *in vitro*. Ispitivani su etanolni ekstrakti korijena i lista obje ljekovite biljne vrste i određena sposobnost ekstrakata da vrše neutralizaciju kako stabilnih organskih radikalskih vrsta (DPPH), tako i dušikovih ili kisikovih radikalskih vrsta.

5.2.6.1.Sposobnost ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane na redukcionu kapacitet

Jedna od standardnih metoda za ispitivanje redukcionih svojstava biljnih ekstrakata je FRAP test. Do elektron transfera Fe^{3+} u Fe^{2+} u *in vivo* uslovima dolazi ako je redoks potencijal elektron-donorskih jedinjenja iz ekstrakta niži od redoks potencijala slobodnih radikala u

oksidoredukcionim parovima. Grafički prikaz uticaja jona teških metala i egzogenog melatonina na redukcionu sposobnost korijena i lista matičnjaka i valerijane dat je na slici 43.



Slika 43. Uticaj melatonina i teških metala na sposobnost redukcije Fe jona /FRAP test/ u korijenu i listu matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

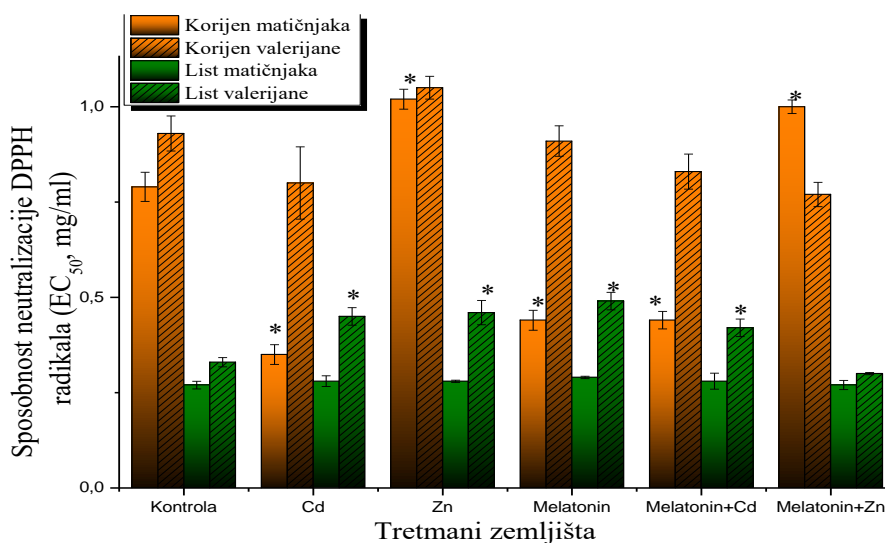
Izlaganjem biljaka matičnjaka jonima kadmija dolazi do povećanja redukcionne sposobnosti njegovog korijena (1,47 µg/g ekstrakta) u odnosu na kontrolu (0,71 µg/g ekstrakta). Povećanje se uočava i kod biljaka prethodno tretiranih egzogenim melatoninom (1,1 µg/g ekstrakta). Nasuprot tome, joni cinka u korijenu matičnjaka su izazvali smanjenje njegove redukcionne moći (0,56 µg/g ekstrakta), koje se opet manifestuje i u korijenu biljaka pretretiranih melatoninom uz tretman cinkom (0,59 µg/g ekstrakta). List matičnjaka pokazuje tri do osam puta veću sposobnost redukcije Fe³⁺ jona. U listovima biljaka izloženih jonima oba teška metala uočava se značajno povećanje redukcionne sposobnosti (4,14 µg/g za Cd i 4,59 µg/g za Zn) u odnosu na kontrolu (2,96 µg/g), što se može pripisati povećanim odbrambenim djelovanjem biljaka usljed njihovog izlaganja stresu. Također, pretretman melatoninom izaziva povećanu redukcionu moć kod lista matičnjaka (3,17 µg/g), uz napomenu da povećanje nije statistički značajno. Promjene u redukcionoj moći nema kod lista matičnjaka pretretiranog melatoninom, uzgajanog na zemljištu kontaminiranom jonima cinka (2,89 µg/g ekstrakta), u odnosu na kontrolne biljke.

Biljke valerijane uzgajane na zemljištu onečišćenom jonima kadmija i cinka pokazuju povećan redukcionni kapacitet korijena (0,41 µg/g, odnosno 0,49 µg/g). Egzogeni melatonin je

također uticao na značajno povećanje redukcijske moći (0,41 $\mu\text{g/g}$) u odnosu na korijen kontrole (0,35 $\mu\text{g/g}$). Nepromijenjen redukcijski kapacitet uočava se samo u korijenu valerijane tretirane cinkom uz pretretman melatoninom. Nasuprot korijenu, blago smanjena redukcijska sposobnost lista valerijane javlja se kod biljaka tretiranih sa Cd i Zn (0,94 i 1,06 $\mu\text{g/g}$), kao i kod onih pretretiranih melatoninom (1,03 $\mu\text{g/g}$). Porast koncentracije kadmija i cinka u biljkama pretretiranih melatoninom uticao je na povećanje redukcijske sposobnosti lista valerijane (1,54 i 1,43 $\mu\text{g/g}$, pojedinačno).

5.2.6.2. Sposobnost ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane da neutrališu DPPH radikal

DPPH test procjenjuje reaktivnosti ekstrakata prema radikalskim vrstama, odnosno *radical scavenging* aktivnosti. DPPH jedan je od rijetkih stabilnih, komercijalno dostupnih slobodnih radikala. Treba imati u vidu da su, zbog njegove velike stabilnosti, rezultati ovog testa samo gruba procjena ponašanja prema visokoreaktivnim radikalima. Rezultati DPPH testa predstavljeni su na slici 44.



Slika 44. Uticaj melatonina i teških metala na sposobnost neutralizacije DPPH radikala (EC_{50}) u korijenu i listu matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

EC_{50} vrijednosti etanolnih ekstrakata lista matičnjaka varirale su u opsegu 0,27–0,29 mg/mL, a korijena 0,35–1,02 mg/mL.

Prema rezultatima ovog testa, procenat neutralizacije DPPH radikala u korijenovima matičnjaka tretiranih jonima Cd je veći (0,35 mg/mL) u poređenju sa netretiranim korijenovima (0,79 mg/mL), što ukazuje da u uslovima stresa izazvanog jonima kadmija, dolazi do značajnog povećanja sposobnosti neutralizacije DPPH radikala vjerovatno zahvaljujući aktivaciji antioksidativne odbrane manifestovane povećanom biosintezom sekundarnih metabolita u uslovima stresa izazvanog jonima Cd. Nasuprot tome, korijen matičnjaka uzgajan na zemljištu onečišćenom cinkom pokazuje smanjenu sposobnost neutralizacije DPPH radikala (1,02 mg/mL). Egzogeni melatonin je također uticao na statistički značajno povećanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala u korijenu matičnjaka (0,44 mg/mL). Isto tako, korijen biljaka pretretiranih melatoninom pokazuje veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala uz povećanu koncentraciju jona Cd (0,43 mg/mL), ali i redukciju u neutralizaciji uz povećanu koncentraciju jona Zn (0,99 mg/mL).

Značajnu, od dva do tri puta, veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala pokazuje list matičnjaka (0,27 mg/mL). Međutim, nije uočeno značajnije povećanje ili smanjenje neutralizacije u bilo kojem primijenjenom tretmanu, u odnosu na netretirane biljke.

EC₅₀ vrijednosti etanolnih ekstrakata lista valerijane varirale su u opsegu 0,30–0,50 mg/mL, a korijena 0,77–1,05 mg/mL.

Prema rezultatima testa, sposobnost neutralizacije DPPH radikala u korijenovima valerijane tretiranih jonima Cd je veća (0,8 mg/mL) u poređenju sa netretiranim korijenovima (0,93 mg/mL). Nasuprot tome, korijen matičnjaka uzgajanog na zemljištu onečišćenom cinkom pokazuje smanjenu sposobnost neutralizacije DPPH radikala (1,05 mg/mL). Međutim, ni pomenuto povećanje ni smanjenje nije se pokazalo statistički značajno. Egzogeni melatonin je također uticao na povećanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala u korijenu valerijane (0,91 mg/mL) u odnosu na kontrolu. Isto tako, korijen biljaka pretretiranih melatoninom pokazuje veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala uz povećanu koncentraciju jona Cd (0,83 mg/mL) i Zn (0,77 mg/mL), što ukazuje na povećanje antioksidantnog kapaciteta u situacijama oksidativnog stresa izazvanog jonima kadmija.

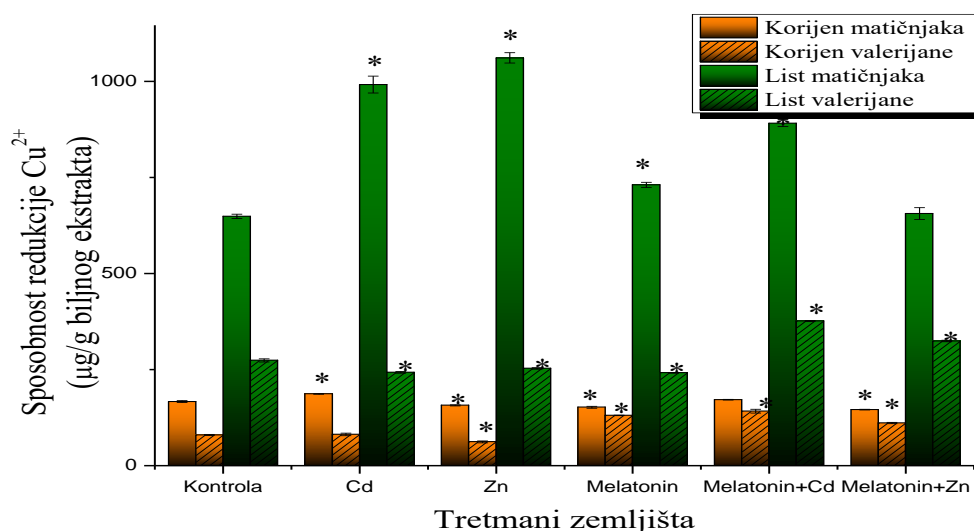
Nekoliko puta veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala pokazuje list valerijane u odnosu na korijen, što se može objasniti većim sadržajem fenolnih jedinjenja. Pretpostavka da su ova jedinjenja odgovorna za uočenu aktivnost je u skladu sa ranijim istraživanjima.

Značajno smanjenu sposobnost neutralizacije DPPH radikala pokazuje list valerijane uzgajane na zemljištu onečišćenom jonima kadmija (0,45 mg/mL) i cinka (0,46 mg/mL), kao i biljke pretretirane sa egzogenim melatoninom (0,49 mg/mL). Istu ili blago smanjenu sposobnost neutralizacije DPPH radikala uočavamo kod listova valerijane pretretirane melatoninom i

uzgajane na zemljištu onečišćenom jonima Cd (0,42 mg/mL) i Zn (0,30 mg/mL). U cilju dokazivanja pretpostavke da je veći sadržaj fenolnih jedinjenja ili melatonina odgovoran za povećanu sposobnost neutralizacije DPPH radikala, aktivnost (izražena kao recipročna vrijednost EC₅₀) korelisana je sa sadržajem fenolnih jedinjenja i melatonina. Zapaža se vrlo visok stepen korelacije (P<0.001) između sadržaja fenola i sposobnosti neutralizacije DPPH radikala što je potvrda da uočena aktivnost prvenstveno potiče od polifenola.

5.2.6.3.Sposobnost ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane da redukuju Cu²⁺, CUPRAC test

U rezultatima CUPRAC testa uočava se da je sposobnost lista matičnjaka i valerijane da redukuju Cu jone značajno veća (tri do četiri puta) u odnosu na korijen obje biljne vrste. Teški metali djelovali su suprotno na redukciju bakra u korijenu matičnjaka i valerijane, u smislu da je Cd izazvao statistički značajno povećanu, a Zn značajno smanjenu sposobnost redukcije (slika 45).



Slika 45. Uticaj melatonina i teških metala na sposobnost redukcije Cu²⁺ /CUPRAC TEST/ u korijenu i listu matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; p<0,05)

Izlaganjem biljaka matičnjaka jonima kadmija dolazi do povećanja sposobnosti redukcije Cu²⁺ u korijenu (186,56 µg/g) u odnosu na kontrolu (166,54 µg/g), ali i lista (991,92 µg/g) u odnosu na kontrolne listove (648,96 µg/g). Nasuprot tome, joni cinka u korijenu matičnjaka

su izazvali smanjenje njegove redukcijske moći (156,9 µg/g), koje se opet manifestuje i u korijenu biljaka pretretiranih melatoninom uz tretman cinkom (145,82 µg/g).

List matičnjaka pokazuje tri do osam puta veću sposobnost redukcije Cu^{2+} jona. U listovima matičnjaka izloženih jonima oba teška metala uočava se značajno povećanje redukcijske sposobnosti u odnosu na kontrolu, što se može pripisati povećanim odbrambenim djelovanjem biljaka usljed njihovog izlaganja stresu. Promjene u redukciji Cu^{2+} nema kod lista matičnjaka pretretiranog melatoninom, uzgajanog na zemljištu kontaminiranom jonima cinka (656,14 µg/g). U svih pet tretmana značajno je povećana sposobnost redukcije Cu^{2+} u korijenu valerijane, dok je kod lista sposobnost redukcije smanjena u biljkama tretiranim jonima Cd i Zn (243,05 µg/g i 253,05 µg/g) u odnosu na kontrolu (273,93 µg/g).

Egzogeni melatonin uticao je na smanjenu sposobnost redukcije Cu jona u korijenu matičnjaka (152,01 µg/g) u odnosu na kontrolu (166,54 µg/g) i listu valerijane (241,55 µg/g) prema kontrolnim listovima (273,93 µg/g). Nasuprot tome, statistički značajno povećanje javlja se u listu matičnjaka (731,00 µg/g) i korijenu valerijane (130,99 µg/g). Uzimajući u obzir činjenicu da se korijen matičnjaka, kao ni list valerijane rijetko koriste u ljekovite svrhe, dobijeni rezultati su ohrabrujući. Egzogeni melatonin u kombinaciji sa tretmanom teškim metalima pokazuje također znatan pozitivan efekat na redukciju Cu jona povećavajući sposobnost i korijena i lista obje biljne vrste u toj ulozi.

Na osnovu rezultata dobijenih različitim testovima antioksidativnog kapaciteta, etanolni ekstrakti lista obje biljne vrste pokazuju značajnu ukupnu antioksidativnu aktivnost. Rezultati istraživanja pokazuju pojačanu antioksidativnu aktivnost biljaka, posebno lista u svim primijenjenim biohemijskim testovima. Pretpostavka je da se povećana antioksidativna aktivnost lista obje biljne vrste može pripisati povećanom sadržaju ukupnih fenola, u odnosu na korijen. U cilju dokazivanja ove pretpostavke ukupna vrijednost melatonina i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja korelisana je sa dobivenim vrijednostima redukcionog kapaciteta ekstrakata (tabela 22). Može se uočiti vrlo visok stepen korelacije između sadržaja fenola i sposobnosti redukcije Fe^{3+} i Cu^{2+} jona, kao i neutralizacije DPPH radikala. Kada je u pitanju melatonin, sa druge strane, pozitivne korelacije nema. Moguće je da je antioksidativno djelovanje melatonina pojačano u korijenu analiziranih biljaka. Budući da je melatonin vrlo nestabilan, teško je pratiti njegov transport u biljnim organelama i organima (van Tassel i O'Neill, 2001). Spomenuto je, naime, da mitohondrije i hloroplasti mogu biti primarna mjesta

sinteze melatonina kod većine ćelija. Korijen je vjerovatno najčešće pomenuti biljni organ u ranijim istraživanjima kao potencijalno mjesto biosinteze melatonina. Međutim, dokazi o ovoj teoriji su još uvijek slabi.

Što se tiče odnosa između sadržaja flavonoida i rezultata FRAP, DPPH i CUPRAC testa uočava se pozitivna korelacija samo sa rezultatima DPPH testa (tabela 22).

Ponašanja biljaka u uslovima oksidativnog stresa u smislu antioksidativne aktivnosti su raznolika. Naprimjer, ispitivane su antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata tri ljekovite biljke (malabarski orah, indijski laburnum i ginseng) sa tri do sedam puta povećanim sadržajem bakra i hroma. Mjerenja ukupne količine fenola, flavonoida, EC_{50} DPPH testa i sposobnosti heliranja metala varirala su među vrstama, ali nije primijećena promjena u antioksidativnoj aktivnosti unutar iste vrste biljaka tretiranih teškim metalima u odnosu na kontrolu (Maharia i sar., 2012).

Sa druge strane, *E. Andevalensis* pokazuje različit sadržaj fenolnih jedinjenja u prisustvu povećanog sadržaja Cd. Biljke izložene najvišim koncentracijama Cd mogu reducirati sintezu ili oslobađanje fenola nepoznatim mehanizmom kako bi izbjegla štetno djelovanje proizvedenih fenoksilnih radikala. Prema drugoj hipotezi, nedostatak povećanja fenola u drugoj grupi biljaka može biti zbog viška kadmija koji utiče na antioksidativni sistem na takav način da biljke nisu u mogućnosti sintetizirati nove fenole. Slična situacija posmatrana je u vrsti trave, *Spartina densiflora*, za koju je prikazano da nije u mogućnosti suprostaviti se visokoj koncentraciji kadmija, ali uspješno reagira sinteteziranjem antioksidativnih metabolita poput askorbinske kiseline i glutaciona u slučajevima izlaganja umjerenim koncentracijama kadmija (Marquez-Garcia i sar., 2012).

Nedavna istraživanja su predstavila da egzogena primjena različitih koncentracija melatonina (0,1, 0,5 i 1 μ M) značajno povećava antioksidativnu sposobnost sadnica kivija, *Actinidia chinensis*, izloženih povećanom salinitetu (100 mM NaCl). Također, značajno je smanjeno i oštećenje istih. Interesantno je da se najefektivnijom pokazala koncentracija melatonina od 0,1 μ M (Xia i sar., 2017).

Tretman egzogenim melatoninom (100 μ mol/L) povećava endogeni sadržaj melatonina zrelih bobica grožđa i vina. Također, u istom istraživanju je povećan je sadržaj ukupnih fenola (posebno singer i kumarinske kiseline), flavonoida i antocijana u vinu, ali i poboljšan antioksidativni efekat vina analiziran preko DPPH i FRAP biohemijskih testova (Xu i sar., 2018).

Salinitet zemljišta je često rezultat navodnjavanja, procesa koji je čest u mnogim dijelovima svijeta (Zhu, 2001). Zbog sposobnosti regulacije sinteze melatonina biljke su tolerantnije

prema toj vrsti kontaminacije. Moguće je da genetički modificirane biljke proizvode povećane količine melatonina (postignuta sposobnost), što im dozvoljava da rastu u zemljištu zagađenom solima (Byeon i sar., 2014).

U kombinaciji sa askorbinskom kiselinom melatonin se koristi u zaštiti sadnica gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) iz okoline sa visokom koncentracijom soli (Kostopoulou i sar., 2015). Istraživane sadnice gorke naranče gajene su pod uslovima plastenika u zemljištu zagađenom sa 100 mM rastvorom NaCl 30 dana. Neke biljke su bile navodnjavane svaka 3 dana vodom koja sadrži 0,5 mM vitamina C i 1 μ M melatonin. Pokazalo se da ova kombinacija ima znatna zaštitna svojstva protiv toksičnosti saliniteta, uključujući smanjenje u „curenju“ elektrolita posredovanih sa NaCl, smanjenje lipidne peroksidacije i razgradnja pigmenta. Korist tretmana askorbinskom kiselinom i melatoninom bila je očita u regulaciji CaMIPS, CaSLAH1 i CaMYB73 (geni povezani sa metabolizmom šećera, jonskom homeostazom i regulacijom transkripcije). Na kraju, promjene uzrokovane pomenutim tretmanom daju dokaze povećane tolerancije gorke naranče prema stresu. Vrijedno je spomenuti da su primjenjene upadljivo različite koncentracije askorbinske kiseline i melatonina u zaštiti protiv saliniteta (0,5 mM i 1 μ M, pojedinačno) (Kostopoulou i sar., 2015).

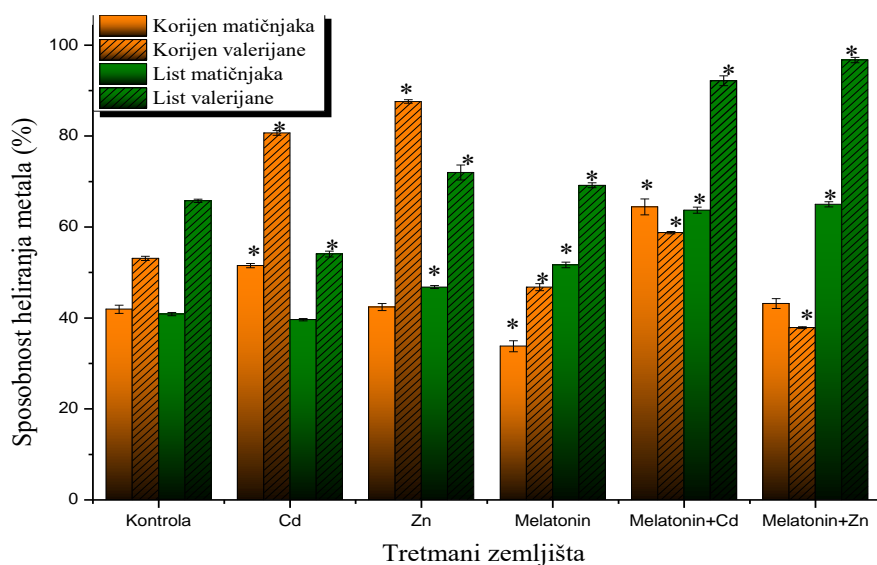
Biljke ili klijanci riže obogaćene melatoninom pokazale su povećanu otpornost na herbicide, butafenacil i agense poznate u proizvodnji visoko reaktivnog singletnog kisika (Park i sar., 2013). Melatoninom obogaćeno sjeme i kontrolno sjeme su klijali i rasli jednako dobro u uslovima konstantnog mraka. Prenošenjem ovih izduženih biljaka na svijetlo kod kontrolnih biljaka uočena je nekroza, dok su one koje su sadržavale genetički više količine melatonina preživjele. Sadnice sa povećanom količinom melatonina imale su i povećan sadržaj hlorofila i niže koncentracije malondialdehida. Ovo je prvo istraživanje koje pokazuje da melatonin štiti biljku od toksičnosti herbicida, u ovom slučaju onog koji stimulise proizvodnju metabolita aktivnog kisika poznatim u nanošenju oksidativnog oštećenja (Park i sar., 2013).

5.2.7. Uticaj melatonina i teških metala na sposobnost heliranja teških metala

Sposobnost heliranja jona željeza u etanolnim ekstraktima lista i korijena valerijane i matičnjaka prikazana je na slici 46.

Prema dobivenim rezultatima u kontrolnim biljkama ekstrakt lista valerijane dosegao je maksimum sposobnosti heliranja metala od 65,76% pri koncentraciji ekstrakta od 1 mg/mL, dok je najmanju sposobnost pokazao korijen matičnjaka i iznosi 41,93%. U korijenu obje

biljne vrste uzgajane na zemljištu onečišćenom Cd i Zn dolazi do statistički značajnog povećanja sposobnosti heliranja željeza (od 0,5 do čak 34,5%).



Slika 46. Uticaj melatonina i teških metala na sposobnost heliranja teških metala za 1 mg/mL koncentracije ekstrakta korijena i lista matičnjaka i valerijane. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju (Tukey test; $p < 0,05$)

U listu obje biljne vrste tretirane sa Cd, za razliku od tretmana sa Zn, uočava se smanjena sposobnost heliranja željeza, iako smanjenje u listu matičnjaka (39,63%) nije statistički značajno. Egzogeni melatonin uticao je na povećanu sposobnost heliranja jona željeza u listu matičnjaka (51,66%) i valerijane (69,16%) u odnosu na kontrolu, kao i na reduciranu sposobnost u korijenu (33,8% matičnjak i 46,76% valerijana). Interesantno, maksimalna sposobnost heliranja željeza uočava se u korijenu i listu biljaka uzgajanih na zemljištu onečišćenom teškim metalima, u kombinaciji sa egzogenim melatoninom, što ukazuje na moguće djelovanje egzogenog melatonina u zaštiti od oksidativnog stresa. Maksimum pokazuje list valerijane tretiran jonima cinka uz egzogeni melatonin (96,73%).

Uzimajući u obzir činjenicu da polifenolna jedinjenja u biološkim sistemima uglavnom ispoljavaju antioksidativnu aktivnost heliranjem prooksidativnih metalnih jona (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}), te nepostojanje značajnosti korelacije između sadržaja ukupnih fenola, te sposobnosti heliranja metala obje biljne vrste, dobiveni rezultati u biljkama tretiranim egzogenim melatoninom, kao i kombinacijom melatonina i metala mogli bi se pripisati samom melatoninu. Vrlo visok stepen korelacije između sadržaja melatonina i sposobnosti heliranja teških metala potvrđuje navedenu hipotezu (tabela 24). Dobiveni rezultati su od

izuzetnog značaja jer pokazuju da se uz dosadašnje dokaze o njegovom učešću u uklanjanju slobodnih radikala, melatonin istovremeno uključuje i u relokaciju teških metala i tako doprinosi smanjenju oksidativnog stresa kod biljaka. Buduća istraživanja će se bazirati na pomenutoj pretpostavci, uz napomenu da do sada nisu identificirana receptorska ili vezujuća mjesta melatonina u biljkama.

Poznato je da izloženost metalima uključuje nekoliko toksičnih efekata. Višak teških metala reaguje sa biološkim makromolekulama i uzrokuje oksidativno oštećenje ćelija. Voltametrijsko istraživanje pokazalo je da se melatonin i prekursori melatonina mogu vezati za nekoliko toksičnih metala poput aluminija, kadmija, bakra, željeza, olova i cinka, što posebno ukazuje na moguću ulogu melatonina u detoksifikaciji metala, te akumulaciju aluminija u Alzhajmerovoj bolesti. Prikazano je da melatonin utiče na biološke sisteme ne samo direktnim uklanjanjem slobodnih radikala, nego i heliranjem toksičnih metala (Romero i sar., 2014). Melatonin, dakle, „hvata“ teške metale i formira helate deaktivirajući tako njihovu sposobnost da uzrokuju proces stvaranja oksidativnog stresa. Međutim, sa hemijske tačke gledišta nije jednostavno objasniti helatne osobine melatonina, budući da indolni azot nema sposobnost da stvara komplekse sa elektrofilnim elementima i njegov jonski par doprinosi aromatičnosti heterocikličnog jezgre melatonina. Valja napomenuti da svaki metal kojeg bi melatonin mogao helirati treba da ima svojstva u postizanju takvih helirajućih kompleksa uz organometalna pravila za koordinaciju metal-ligand (pravilo 18 elektrona i pravljenje tetraedarskih, oktaedarskih ili kvadratnih planarnih struktura) (Romero i sar., 2014).

Prikazano da su helirajući agensi, koji formiraju σ veze sa metalima, efikasni sekundarni metaboliti jer smanjuju redoks potencijal stabilizirajući tako oksidiranu formu metalnog jona (Gulcin i sar., 2003, Hasan i sar., 2015). Slika 51 pokazuje da melatonin ima značajnu sposobnost vezivanja željeza, posebno u listu ispitivanih biljnih vrsta. Prema tome, možemo pretpostaviti da je njegovo djelovanje u smanjenju lipidne peroksidacije povezano sa tom sposobnošću.

Skorija istraživanja ističu da egzogeno primjenjeni melatonin poboljšava prilagođavanje biljke arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) na nedostatak željeza, tako što utiče na remobilizaciju željeza. Utvrđeno je da je navedeni proces povezan sa nivoima ćelijskog poliamina. Isto tako, tretmani melatoninom nisu mogli ublažiti hlорозу uzrokovanu nedostatkom željeza u biljkama sa deficitom poliamina ili NO. Dakle, rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju na to da egzogeni melatonin povećava otpornost biljaka na nedostatak željeza kroz indukciju akumulacije NO posredovane poliaminom (Zhou i sar., 2016). Posebno

je prikazana vrlo niska povezanost nivoa fluorescencije sa NO u korijenu netretiranih biljaka, koja se značajno povećava nakon 16h izloženosti melatoninu pod uvjetima povećane koncentracije željeza. Nadalje, izlaganjem biljaka manjku jona željeza nivoi NO su znatno povećani, a tretman melatoninom je doveo do daljnjeg povećanja akumulacije NO u korijenima (Zhou i sar., 2016).

Ranija istraživanja su također pokazala da melatonin ima značajnu sposobnost heliranja teških metala. Studija je provedena kako bi se procijenila aktivnost melatonina u heliranju metala i neutralisanju H₂O₂. Obje aktivnosti su rasle sa povećanjem koncentracije melatonina (20-60 µg/mL). Koncentracija melatonina od 60 µg/mL pokazala je efekat heliranja jona željeza za 95%, kao i 83% oslobađanja H₂O₂ (Gulcin i sar., 2003).

5.2.8. Analiza glavnih komponenti praćenih hemijskih parametara

Analiza glavnih komponenti (Hotelling, 1936), provedena na osnovu korelacijske matrice u koju su bile uključene srednje vrijednosti hemijskih varijabli kod 24 kombinacije modaliteta hemijskog spoja i biljne vrste, rezultirala je kreiranjem 13 hemijskih varijabli. Prvih pet konstruisanih sintetskih varijabli je detaljnije analizirano kroz njihove svojstvene vrijednosti i udio koji su ove varijable imale u ukupnoj varijansi. Analizom glavnih komponenti nad korelacijskom matricom 13 hemijskih varijabli, prvih pet glavnih komponenti sadržavalo je 90,62% ukupne varijanse, sa pojedinim svojstvenim vrijednostima od 0,50 (Tabela 19).

Tabela 19. Svojstvena vrijednost, udio varijanse i kumulativna varijansa povezana s prvih pet glavnih komponenti (PC), procijenjenih iz korelacijske matrice s 13 hemijskih varijabli kod 24 kombinacije modaliteta biljnog organa i hemijskog spoja

Varijable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Svojstvena vrijednost	6,88	2,84	1,14	0,71	0,50
Udio varijanse (%)	52,91	21,82	8,79	5,49	3,88
Kumulativna varijansa (%)	52,91	72,46	81,25	86,74	90,62

U tabeli 20 prikazana su identifikovana svojstva sa najvećim doprinosom ukupnoj varijabilnosti analiziranog materijala biljke, analizom vrijednosti svojstvenih vektora svih izvornih varijabli u prvih pet komponenti.

Tabela 20. Doprinos svakog od 13 hemijskih analiziranih svojstava u ukupnoj varijabilnosti eksperimenta (boldirani značajni izvori varijabilnosti).

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5
Melatonin	0,0251	0,4645	0,4026	-0,3013	-0,2782
Zn	0,2610	0,1761	0,5177	0,2528	0,2524
Cd	-0,0466	0,4887	0,0684	0,4912	0,3865
Mg	0,3028	0,0072	0,3085	-0,0224	-0,4451
Ca	0,3372	0,0999	-0,0045	0,2724	-0,3680
Fenoli	0,3517	-0,1903	0,0332	-0,0325	0,1623
Flavonoidi	0,2300	0,3127	-0,4325	0,3183	-0,2342
Proteini	0,3431	-0,0429	0,0445	-0,2795	0,3430
Peroksidaze	-0,2956	-0,2203	0,2067	0,4064	0,1303
FRAP	0,3458	-0,2116	0,0240	-0,0306	0,2104
DPPH	-0,3096	0,0498	0,4065	-0,1696	0,0078
CUPRAC	0,3519	-0,1796	0,0865	0,0348	0,1390
Heliranje	0,0525	0,4904	-0,2528	-0,3909	0,3108

Varijable sa najvećim svojstvenim vektorima u svakoj od glavnih komponenti su sljedeće:

- **PC1:** sadržaj fenola, sadržaj proteina, sposobnost ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane na redukcionu kapacitet-FRAP test, sposobnost ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane da redukuju Cu^{2+} -CUPRAC test
- **PC2:** sadržaj melatonina, sposobnost heliranja teških metala;
- **PC3:** sadržaj cinka, flavonoidi, sposobnost neutralizacije DPPH radikala;
- **PC4:** sadržaj kadmija, aktivnost peroksidaza;
- **PC5:** sadržaj kalcija i magnezija.

Sve posmatrane osobine su prisutne sa visokom vrijednošću u nekoj od prvih pet glavnih komponenti. Sve komponente su prethodno detaljnije analizirane. Najznačajnija svojstva u prvoj glavnoj komponenti, koja nosi 52,91% ukupne varijabilnosti eksperimenta, su fenoli, proteini, sposobnost ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane na redukcionu kapacitet-FRAP test, sposobnost ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane da redukuju Cu^{2+} -CUPRAC test. Vrijednost od 21,82% ukupne varijabilnosti eksperimenta, koja je sadržana u drugoj glavnoj komponenti, najviše su doprinijele osobine sadržaja melatonina i sposobnost heliranja teških metala. Upotrebom glavnih komponenti (PC1 i PC2) kao prostornih dimenzija (ose x i y), konstruisan je set dvodimenzionalnih grafikona na kojima su predstavljeni međuodnosi izvornih kvantitativnih osobina, kao i prostorna distribucija analiziranih kombinacija modaliteta oglednih faktora (grafikon 3 i 4, u prilogu rada).

Na grafikonu 3 predstavljena su pojedina praćena svojstva prikazana u vidu vektora. Analizom glavnih komponenti određena je dužina vektora koja odražava ukupnu varijabilnost varijable koju dati vektor predstavlja. Dok se veći nivo varijabilnosti javlja kod veće dužine vektora, blizina pojedinih vektora odražava njihov nivo korelacije. Svojstva su u većoj korelaciji što su im vektori bliži. Grafikon 4 predstavlja razdvajanje analiziranih biljnih organa matičnjaka i valerijane na osnovu 24 kombinacije organa i hemijskog spoja. Grafikon 3 prikazuje postojanje izuzetno pozitivne korelacije između osobina sadržaja melatonina i sposobnosti heliranja metala, kao i sadržaja fenola, sposobnosti ekstrakata lista i korijena matičnjaka i valerijane na redukcionom kapacitet-FRAP test, te sposobnosti ekstrakata da redukuju Cu²⁺-CUPRAC test. Kada su u pitanju prve dvije navedene osobine zaključak da melatonin ima izuzetnu sposobnost heliranja teških metala, što je i objašnjeno prethodno u radu, je jedini logičan. Fenoli, sa druge strane, odgovorni su najviše za antioksidativno djelovanje biljnih vrsta. U tabeli 21 prikazane su statistički značajne promjene u mjerenim parametrima biljnih vrsta pretretiranih melatoninom u odnosu na kontrolne biljke, dok su u tabeli 22 vrijednosti nivoa značajnosti korelacije između 25 kvantitativnih osobina (dvanaest morfometrijskih i fizioloških, te trinaest hemijskih) izmjerenih kod lista i korijena matičnjaka i valerijane. Boldirane vrijednosti predstavljaju slučajeve gdje je pozitivna i negativna korelacija statistički značajna (P < 0,01). Navedeni odnosi neće biti komentarisani, budući da je to urađeno u prethodnim poglavljima.

Tabela 21. Statistički značajne promjene mjerenih hemijskih parametara u biljnim vrstama pretretiranih melatoninom

Ispitivani parametar	Ispitivani biljni organ			
	Korijen matičnjaka	List matičnjaka	Korijen valerijane	List valerijane
Zn	/	/	/	+
Cd	+	+	+	+
Mg	/	/	/	/
Ca	/	-	/	/
Fenoli	+	+	+	-
Flavonoidi	+	-	+	-
Proteini	+	+	+	+
Aktivnost peroksidaza	+	-	+	-
FRAP	+	+	/	/
DPPH	-	/	/	+
CUPRAC	-	+	+	-
Heliranje metala	-	+	-	+
Hlorofil A	/	-	/	+
Hlorofil B	/	-	/	+
Karotenoidi	/	-	/	+

+ povećanje sadržaja; - smanjenje sadržaja; /nema značajne promjene

Tabela 22. Nivo značajnosti korelacije (Pearsonov koeficijent korelacije) za 13 hemijskih i 12 morfometrijskih i fizioloških svojstava

P/r	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
E1		0,05	0,01	0,37	0,40	0,48	0,28	0,91	0,11	0,34	0,34	0,50	0,01	0,00	0,14	1,00	0,03	0,04	0,04	0,11	0,08	0,01	0,08	0,42	0,16
E2	0,40		0,16	0,00	0,00	0,01	0,10	0,00	0,03	0,01	0,11	0,00	0,41	0,00	0,18	0,44	0,01	0,01	0,00	0,13	0,01	0,00	0,07	0,30	0,06
E3	0,50	0,30		0,57	0,89	0,09	0,08	0,37	0,78	0,07	0,54	0,15	0,01	0,29	0,85	0,18	0,04	0,19	0,69	0,08	0,41	0,13	0,53	0,51	0,25
E4	0,19	0,66	-0,12		0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,96	0,00	0,34	0,52	0,01	0,00	0,01	0,11	0,03	0,00	0,10	0,23	0,15
E5	0,18	0,66	0,03	0,72		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52	0,00	0,14	0,15	0,08	0,02	0,00	0,37	0,00	0,01	0,03	0,19	0,06
E6	-0,15	0,55	-0,36	0,67	0,73		0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59	0,00	0,10	0,61	0,01	0,00	0,01	0,08	0,03	0,00	0,04	0,19	0,08
E7	0,23	0,34	0,37	0,36	0,73	0,36		0,06	0,00	0,13	0,00	0,09	0,01	0,00	0,13	0,58	0,01	0,00	0,00	0,09	0,01	0,00	0,00	0,04	0,01
E8	0,02	0,61	-0,19	0,68	0,65	0,87	0,39		0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,00	0,44	0,85	0,00	0,00	0,06	0,03	0,14	0,00	0,19	0,40	0,17
E9	-0,33	-0,43	-0,06	-0,57	-0,70	-0,57	-0,66	-0,71		0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,17	0,99	0,00	0,00	0,04	0,02	0,12	0,00	0,17	0,32	0,11
E10	-0,21	0,53	-0,37	0,65	0,71	0,99	0,32	0,85	-0,56		0,00	0,00	0,53	0,00	0,12	0,60	0,01	0,00	0,00	0,07	0,02	0,00	0,02	0,12	0,04
E11	0,21	-0,33	0,13	-0,54	-0,68	-0,74	-0,65	-0,69	0,64	-0,73		0,00	0,67	0,01	0,22	0,68	0,04	0,00	0,08	0,21	0,18	0,02	0,03	0,03	0,02
E12	-0,14	0,59	-0,31	0,70	0,76	0,98	0,36	0,85	-0,57	0,99	-0,69		0,52	0,00	0,14	0,50	0,01	0,00	0,00	0,09	0,01	0,00	0,04	0,20	0,08
E13	0,54	0,18	0,54	0,01	0,14	-0,12	0,52	0,16	-0,52	-0,13	-0,09	-0,14		0,38	0,70	0,19	0,06	0,11	0,71	0,08	0,53	0,15	0,87	0,75	0,67
H1	-0,81	-0,88	-0,33	-0,82	-0,86	-0,96	-0,95	-0,83	0,83	-0,97	0,71	-0,97	-0,28		0,05	0,92	0,00	0,00	0,01	0,02	0,04	0,00	0,02	0,16	0,07
H2	-0,46	-0,42	-0,06	-0,30	-0,45	-0,49	-0,46	-0,25	0,43	-0,48	0,39	-0,45	-0,12	0,57		0,52	0,25	0,09	0,33	0,22	0,41	0,19	0,22	0,75	0,34
H3	0,00	0,25	-0,41	0,21	0,44	0,16	0,18	0,06	0,00	0,17	-0,13	0,22	-0,40	-0,03	0,21		0,21	0,67	0,03	0,02	0,01	0,64	0,79	0,73	0,66
H4	-0,62	-0,69	-0,59	-0,69	-0,52	-0,72	-0,71	-0,81	0,82	-0,73	0,59	-0,71	-0,55	0,81	0,36	0,39		0,00	0,38	0,00	0,68	0,00	0,13	0,24	0,09
H5	-0,59	-0,70	-0,41	-0,76	-0,65	-0,82	-0,82	-0,75	0,87	-0,83	0,78	-0,80	-0,49	0,89	0,52	0,14	0,85		0,11	0,01	0,30	0,00	0,08	0,14	0,12
H6	0,61	0,80	-0,13	0,71	0,95	0,74	0,82	0,56	-0,60	0,77	-0,52	0,80	-0,12	-0,71	-0,31	0,64	-0,28	-0,48		0,94	0,00	0,07	0,07	0,25	0,14
H7	-0,49	-0,46	-0,52	-0,49	-0,28	-0,53	-0,52	-0,62	0,65	-0,54	0,39	-0,51	-0,52	0,66	0,38	0,65	0,94	0,73	-0,02		0,74	0,00	0,21	0,35	0,19
H8	0,53	0,72	-0,26	0,62	0,89	0,62	0,71	0,45	-0,47	0,65	-0,41	0,69	-0,20	-0,59	-0,26	0,70	-0,13	-0,33	0,98	0,11		0,18	0,10	0,32	0,20
H9	-0,73	-0,84	-0,47	-0,81	-0,74	-0,85	-0,86	-0,88	0,89	-0,86	0,67	-0,86	-0,45	0,92	0,41	0,15	0,96	0,88	-0,54	0,83	-0,41		0,05	0,16	0,04
H10	-0,52	-0,55	-0,20	-0,50	-0,63	-0,61	-0,77	-0,41	0,42	-0,66	0,63	-0,60	-0,05	0,64	0,38	0,08	0,47	0,53	-0,55	0,39	-0,50	0,58		0,00	0,00
H11	-0,26	-0,33	-0,21	-0,37	-0,41	-0,40	-0,60	-0,27	0,31	-0,48	0,62	-0,40	-0,11	0,43	0,10	0,11	0,37	0,45	-0,36	0,29	-0,32	0,43	0,92		0,00
H12	-0,43	-0,55	-0,36	-0,44	-0,56	-0,53	-0,70	-0,42	0,48	-0,59	0,65	-0,52	-0,14	0,54	0,30	0,14	0,51	0,48	-0,45	0,41	-0,39	0,59	0,92	0,88	

E1-sadržaj melatonina, E2-sadržaj Zn, E3-sadržaj Cd, E4-sadržaj Mg, E5-sadržaj Ca, E6-sadržaj fenola, E7-sadržaj flavonoida, E8-sadržaj proteina, E9-sadržaj peroskidaza, E10- FRAP, E11-DPPH, E12-CUPRAC, E13-sposobnost heliranja metala, H1-visina biljke, H2-prečnik biljke, H3-masa svježe biljke, H4-masa suhe biljke, H5-razvijnost korijena, H6-masa svježeg korijena, H7-masa svježe stabljike, H8-masa suhog korijena, H9-masa suhe stabljike, H10-hlorofil A, H11-hlorofil B, H12-karotenoidi

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu po prvi put izvršeno je kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja melatonina u biljnim vrstama *Melissa officinalis* L i *Valeriana officinalis* L. Također, ispitane su i funkcije pretretmana melatoninom pri izlaganju biljaka oksidativnom stresu, tretiranjem maksimalno dozvoljenim koncentracijama kadmija i cinka. Prema rezultatima morfometrijskih, fizioloških i hemijskih parametara ispitivanih vrsta pod uticajem teških metala (Zn^{2+} i Cd^{2+}) u zemljištu i pretretmana melatoninom moguće je izvesti sljedeće zaključke:

- Primjenom HPLC-FLD i HPLC-DAD tehnike melatonin je identifikovan u obje analizirane biljne vrste, a njegov je sadržaj u najvišim granicama objavljenim za suhe biljke do sada. Prisutne su jasne razlike u sadržaju melatonina među biljkama, ali i među analiziranim biljnim organima, sa značajno većom količinom ovog hormona kod valerijane, u odnosu na matičnjak (povećanje za dva do čak deset puta). List valerijane je bogatiji melatoninom u odnosu na korijen, dok se kod matičnjaka uočava suprotno, što je i razumljivo ako se uzme u obzir da upravo ti specifični organi pokazuju ljekovito djelovanje. Pretretman melatoninom uticao je na povećanje sadržaja melatonina u odnosu na kontrolu, osim u korijenu valerijane, gdje se uočava statistički značajno smanjenje njegove koncentracije. Dugi kišni period prije i tokom uzorkovanja ove biljne vrste mogao je uticati na uočene niže koncentracije endogenog melatonina. Uočava se povećanje koncentracije melatonina u listu i korijenu obje biljne vrste tretirane sa toksičnim metalima, negdje čak i za dvostruku vrijednost, što potvrđuje pozitivno djelovanje melatonina u povećanju otpornosti biljaka, izloženih visokim koncentracijama teških metala, inducirajući adaptivni odgovor u biljkama. Isti efekat se uočava u listu i korijenu matičnjaka pretretiranog melatoninom, uz izlaganje jonima teških metala, dok valerijana pokazuje smanjenje sadržaja endogenog melatonina.
- Rezultati analize poljoprivrednog zemljišta pokazali su prisustvo oba primjenjena teška metala u zemljišnom mediju. Male su razlike usvojenih količina teških metala iz zemljišta u dvije analizirane biljne vrste, što ukazuje na činjenicu da su biljke usvojile vrlo male količine Zn iz zemljišnog medija. Budući da je transport biodostupnih jona kroz plazma membranu korijena kritični korak u unosu i akumulaciji metala moguće da je izostala brza i linearna dinamička faza adsorpcije Zn^{2+} na ćelijski zid korijena, ili pak zasićeni stadij adsorpcije koji je u vezi sa prijenosom Zn^{2+} kroz plazma membranu ćelije

korijena. Iako se radi o relativno niskim koncentracijama, egzogenom primjenom melatonina povećan je unos Zn i Cd u korijen, kao i njihova translokacija u listove obje analizirane biljne vrste. Za razliku od cinka biljke su usvojile značajnije količine kadmija, iako njegova koncentracija u ispitivanim biljnim organima nije prelazila koncentraciju koja bi imala toksičan efekat po rast i razvoj biljke. Eksperimentalno je dokazana smanjena biodostupnost jona Cd u zemljištu tretiranom sulfatnim solima Cd, ali i pozitivna korelacija sa sadržajem melatonina.

- Egzogeno primjena melatonina imala je pozitivan efekat na morfološke karakteristike matičnjaka povećavajući visinu i prečnik biljke, te razvijenost korijena, dok se kod valerijane pozitivan uticaj melatonina ogleda u povećanju mase biljke. Očekivano, tretman kadmijem imao je vrlo negativan uticaj na sve morfometrijske karakteristike obje biljne vrste. Ulazak Cd kroz kanal Ca u listovima biljaka smanjuje stepen iskorištenja vode, uzrokujući zatvaranje stoma u mnogim biljnim vrstama i vodeći do smanjenja brzine transpiracije, te inhibicije fotosinteze nepovoljnim djelovanjem na metabolizam hlorofila, a kao posljedica javlja se inhibicija rasta i neravnoteža u nivou hranjivih tvari. Negativni efekat kadmija smanjen je u biljkama pretretiranim melatoninom, čime se potvrđuje hipoteza o pozitivnom djelovanju melatonina u rastu i razvoju biljnih vrsta, posebno pod uticajem hemijskih stresora. Cink, sa druge strane nije izazvao statistički značajne promjene pomenutih parametara u odnosu na kontrolne biljke. Promatrane smanjene vrijednosti većine morfometrijskih parametara mogu se pripisati i nedostatku biodostupnog cinka u zemljišnom mediju.
- Promjene u parametrima fotosinteze pokazuju ovisnost o vrsti biljke. Smanjen sadržaj pigmenata hloroplasta uočava se u svim tretmanima matičnjaka. Iako je izlaganje kadmiju i cinku rezultiralo značajnim povećanjem endogenih količina melatonina u matičnjaka, koncentracije hlorofila a i b, te karotenoida pokazale su inverznu korelaciju i pale su kao rezultat izlaganja metalima. Dodatkom egzogenog melatonina, međutim, ublaženo je smanjenje koncentracije biljnih pigmenata. Pozitivnog djelovanja samog pretretmana melatoninom na pigmente hloroplasta nema. Za razliku od matičnjaka, hlorofil a, b i karotenoidi povećani su u biljkama pretretiranim melatoninom. Također, pod uticajem teških metala promatra se ista pojava povećanja pigmenata hloroplasta. Moguće je da melatonin štiti fotosintetski aparat od oštećenja nastalog djelovanjem teških metala. Dobijeni, naizgled kontradiktorni rezultati mogu biti objašnjeni

činjenicom da reaktivne kisikove vrste ne oštećuju (oksidiraju) samo hlorofile, nego i druga jedinjenja fotosintetskog lanca prijenosa elektrona. Stoga, primjena egzogenog melatonina može smanjiti oštećenja nastala djelovanjem pomenutih vrsta mnogih fotosintetskih jedinjenja.

- Rezultati analize makronutrijenata pokazala je da matičnjak i valerijana sadrže relativno niske koncentracije Mg, posebno u korijenu. Djelovanjem jona teških metala, nije došlo do smanjenja sadržaja makronutrijenata Ca i Mg u korijenovima obje analizirane biljne vrste. Naprotiv, i korijen i list matičnjaka pokazuju povećane vrijednosti Ca i Mg u biljkama tretiranim jonima Cd i Zn, moguće usljed činjenice da se Cd, kao dvovalentni kation može biti u kompeticiji sa jonima Ca, Mg u njihovom transportu kroz membrane. Pomenuta kompeticija između nutrijenata i toksičnih metala u biljkama za vezujuća mjesta u ćelijskom zidu, plazma membrani utiče i na distribuciju toksičnih metala. Pretretman melatoninom nije imao značajan uticaj na koncentraciju makroelemenata u ispitivanim organima matičnjaka i valerijane.
- Veća koncentracija proteina sadržana je u listu u odnosu na korijen ispitivanih biljnih vrsta. Dokazano je da se sadržaj proteina povećava djelovanjem jona teških metala. Također, u svim ispitivanim biljnim organima pretretiranih melatoninom, sa i bez prisustva teških metala, uočeno je statistički značajno povećanje sadržaja proteina, čime se dokazuje djelovanje melatonina u regulaciji proteina pri izlaganju biljaka hemijskom stresu.
- Tretmani jonima teških metala doveli su do pojave smanjenja aktivnosti peroksidaza u korijenu i listu ispitivanih biljnih vrsta u odnosu na kontrole. Veća aktivnost enzima bilježi se u korijenovima u odnosu na aktivnost enzima u listovima matičnjaka i valerijane. Interesantno, korijenovi ispitivanih biljnih vrsta pretretiranih melatoninom pokazuju statistički značajno povećanje aktivnosti peroksidaza, dok se kod listova uočava suprotan efekat. Povećano je zaštitno djelovanje melatonina u korijenu ispitivanih biljnih vrsta u odnosu na list pri izlaganju biljaka hemijskom stresu.
- Promjene ispitivanih parametara (sadržaj fenola, flavonoida, proteina) u ekstraktima korijena i lista matičnjaka i valerijane ukazuju da je oksidativni stres nastao djelovanjem povećane koncentracije jona kadmija i vjerovatno smanjene koncentracije cinka.

Povećanjem aktivnosti peroksidaza u korijenovima matičnjaka i valerijane pretretirane melatoninom vjerovatno dolazi do smanjenja koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta i do ublažavanja oksidativnog stresa.

- Promjene u neenzimskoj (fenoli i flavonoidi) i enzimskoj (peroksidaze i superoksid dismutaze) antioksidativnoj aktivnosti matičnjaka i valerijane su pokazale da melatonin u uslovima stresa izazvanog teškim metalima poboljšava tolerantnost ispitivanih biljnih vrsta na stres.
- Promjene u aktivnosti superoksid dismutaza kod biljaka izloženih povišenim koncentracijama Cd i Zn ovise o vrsti i fazi razvoja biljke. Povećana aktivnost SOD mjerena je u listovima matičnjaka, a najveća vrijednost se javlja u zadnjoj fazi razvoja biljke. U listovima valerijane pretretirane melatoninom uočava se smanjena aktivnost SOD.
- Dokazano je da onečišćenjem zemljišta jonima kadmija i cinka dolazi do povećanja redukcionog kapaciteta etanolnih ekstrakata korijena a posebno lista matičnjaka (gdje se uočava udvostručeno povećanje redukcionog kapaciteta), te korijena valerijane. Pretretman egzogenim melatoninom utiče na povećanje redukcijske moći u svim ispitivanim biljnim organima, osim u listu valerijane, gdje značajnije promjene nema. Utvrđen je vrlo visok stepen korelacije sa sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja i proteina.
- U svim ekstraktima utvrđen je antioksidativni kapacitet u odnosu na DPPH radikal. Djelovanjem jona kadmija dolazi do smanjenja neutralizacije DPPH radikala u korijenovima obje ispitivane biljne vrste, dok se u listovima uočava povećanje sposobnosti ekstrakata u neutralizaciji ovog radikala. Utvrđen je vrlo visok stepen korelacije sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida.
- Određeno je povećanje sposobnosti etanolnih ekstrakata da redukuju jone bakra CUPRAC testom u biljkama uzgajanim na zemljištu onečišćenom kadmijem, kod svih biljnih organa osim u listovima valerijane, u kojima je utvrđen i smanjen sadržaj fenola. Joni cinka sa druge strane uticali su na statistički značajno smanjenu sposobnost redukcije Cu jona, što je razumljivo uzimajući u obzir činjenicu da se simptomi nedostatka cinka u biljkama javljaju kada je njegova koncentracija u listu ispod 15

mg/kg suhe mase. Utvrđena je značajna korelacija između sadržaja cinka i sposobnosti redukcije Cu jona. Egzogeni melatonin utiče na statistički značajno povećanje sposobnosti redukcije jona bakra u listovima matičnjaka, te korijenovima valerijane, dok se suprotan efekat uočava u drugim ispitivanim biljnim organima.

- Korijenovi obje ispitivane biljne vrste pretretirani melatoninom pokazuju smanjenu sposobnost heliranja teških metala. Upravo suprotan efekat pretretmana uočava se u listovima biljaka. Utvrđena je pozitivna korelacija između sadržaja melatonina i sposobnosti etanolnih ekstrakata da heliraju željezo. Dobiveni rezultati su od izuzetnog značaja jer pokazuju da se uz dosadašnje dokaze o njegovom učešću u neutralisanju slobodnih radikala, melatonin istovremeno uključuje i u relokaciju teških metala i tako doprinosi smanjenju oksidativnog stresa kod biljaka.
- Primjenom analize glavnih komponenti nad korelacijskom matricom sa 12 morfometrijskih i fizioloških varijabli, prvih pet glavnih komponenti sadržavalo je 98,39% ukupne varijanse sa pojedinim svojstvenim vrijednostima preko 0,24. Analiza glavnih komponenti nad korelacijskom matricom sa 13 hemijskih varijabli, prvih pet glavnih komponenti sadržavalo je 90,62% ukupne varijanse sa pojedinim svojstvenim vrijednostima preko 0,50.
- Očigledno je da melatonin ublažava oštećenja u ispitivanim biljnim organima smanjenjem prekomjerne proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta uzrokovane hemijskim stresom, upravo zbog svojih antioksidativnih svojstava i stimulirajućih efekata na antioksidativni sistem. Egzogeno primijenjen melatonin pomaže u poboljšanju tolerancije biljaka na stresno okruženje. Melatonin se također može sintetizirati i iskoristiti od strane biljke. Biljke akumuliraju više koncentracije melatonina pri suočavanju oštrim uvjetima okruženja. Genetičkom modifikacijom moguće je povećati sintezu melatonina u transgenim biljkama i poboljšati tako njihovu otpornost na nepovoljne uvjete, što će biti predmet budućih istraživanja.
- Na kraju, ova vrlo aktivna molekula ima ogroman potencijal za istraživanje u razumijevanju osnovnih životnih funkcija i nudi mogućnosti za poboljšanje raznolikosti procesa u kultivaciji biljaka i industrijskoj poljoprivredi.

7. LITERATURA

- Abdellatif, F., Boudjella, H., Zitouni, A., Hassani, A. (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of algerian *Melissa officinalis* L. *EXCLI Journal*, 13, 772-781.
- Abosedo, O. A. (2017). Review on heavy metals contamination in the environment. *European Journal of Earth and Environment*, 4, 1.
- Abrahamsson, K., Choo, K. S., Pedersen, M., Johansson, G., Snoeijs, P. (2003). Effects of temperature on the production of hydrogen peroxide i volatile halocarbons by brackish-water algae. *Phytochemistry*, 64, 725–734.
- Albert, T. Y., Hsu Cheng-Non. (2005). Electrokinetic remediation of cadmium-contaminated clay. *J Environ Eng.*, 131, 298–304.
- Alia, N., Sardar, K., Said, M., Salma, K., Sadia, A., Sadaf, S., Toqeer, A., Miklas, S. (2015). Toxicity and bioaccumulation of heavy metals in spinach (*Spinacia oleracea*) grown in a controlled environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12, 7400-7416.
- Alloway, B. J. (2008). Zinc in soils and crop nutrition. IZA Publications. *International Zinc Association*, Brussels, 1–116.
- Afreen, F., Zobayed, S. M. A., Kozai, T. (2006). Melatonin in *Glycyrrhiza uralensis*: response of plant roots to spectral quality of light and UV-B radiation. *J. of Pineal Res.*, 41, 108–115.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Arnao, M. B., Hernandez-Ruiz, J. (2009a). Assessment of different sample processing procedures applied to the determination of melatonin in plants. *Phytochem Anal.*, 20, 14–18.
- Arnao, M. B., Hernandez-Ruiz, J. (2007). Melatonin in plants: More studies are necessary. *Plant Signal Behaviour*, 2, 381–382.
- Arnao, M. B., Hernandez-Ruiz, J. (2009b). Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots. *Journal of Pineal Research*, 46, 295–299.
- Arnao, M. B., Hernandez-Ruiz, J. (2013). Growth conditions determine different melatonin levels in *Lupinus albus* L. *Journal of Pineal Research*, 55, 149–155.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 50, 601-639.

- Badria, F. (2002). Melatonin, serotonin, and tryptamine in some Egyptian food and medicinal plants. *Journal of medicinal food*, 5(3), 153-157.
- Banerjee, S., Margulis, L. (1973). Mitotic arrest by melatonin. *Experimental Cell Research*, 78, 314-318.
- Bajwa, V. S., Shukla, M. R., Sherif, S. M., Murch, S. J., Saxena, P. K. (2014). Role of melatonin in alleviating cold stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Pineal Research*, 56, 238-245.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.*, 299, 15-27.
- Blask, D. E., Dauchy, R. T., Sauer L. A., and Krause, J. A. (2004). Melatonin Uptake and Growth Prevention in Rat Hepatoma 7288ctc in Response to Dietary Melatonin: Melatonin Receptor-Mediated Inhibition of Tumor Linoleic Acid Metabolism to the Growth Signaling Molecule 13- Hydroxyoctadecadienoic Acid and the Potential Role of Phytomelatonin. *Carcinogenesis*, 25(6), 951-960.
- Boccalandro, H. E., Gonzales, C. V., Wunderlin, D. A., Silva, M. F. (2011). Melatonin levels, determined by LC-ESI-MS/MS, fluctuate during the day/night cycle in *Vitis vinifera* cv Malbec: evidence of its antioxidant role in fruits. *Journal of pineal research*, 51(2), 226-232.
- Bradley, P. (ed.). (1992). *British Herbal Compendium — A Handbook of Scientific Information on Widely Used Plant Drugs, Volume I*. Exeter, U.K.: British Herbal Medicine Association (BHMA), 214-8.
- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P. (2007). Zinc in plants. *New phytologist*, 173, 677-702.
- Bromme, H. J., Peschke, E., and Israel, G. (2008). Photo-Degradation of Melatonin: Influence of Argon, Hydrogen Peroxide, and Ethanol. *Journal of Pineal Research*, 44(4), 366-372.
- Burkhardt, S., Tan, D. X., Manchester, L. C., Hardeland, R. Reiter, R. J. (2001). Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). *J. Agric. Food Chemistry*, 49, 4898-4902.
- Byeon, Y., Park, S., Lee, H. Y., Kim, Y. S., Back, K. (2014). Elevated production of melatonin in transgenic rice seeds expressing rice tryptophan decarboxylase. *Journal of Pineal Research*, 56, 275-282.

- Byeon, Y. Back, K. (2014). An increase in melatonin in transgenic rice causes pleiotropic phenotypes, including enhanced seedling growth, delayed flowering and low grain yield. *Journal of Pineal Research*, 56, 408–414.
- Byeon, Y., Hyoungh Y. L., Hwang, O. J. Lee, H-J., Lee, K., Back, K. (2015). Coordinated regulation of melatonin synthesis and degradation genes in rice leaves in response to cadmium treatment. *Journal of Pineal Research*, 58, 470–478.
- Ceraulo, L., M. Ferrugia, L. Tesoriere, S. Segreto, M. A. Livrea and T. Liveri. (1999). Interactions of Melatonin with Membrane Models: Portioning of Melatonin in Aot and Lecithin Reversed Micelles. *Journal of Pineal Research*, 26(2), 108-112.
- Chalker-Scott, L. (2002). *Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues, In Anthocyanins in Leaves. Advances in Botanical Research*, vol. 37, Gould, K.S. and Lee, D.W., Eds., Academic Press, Amsterdam, 103.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Analysis*, 10, 178-182.
- Chen, G. F., Y. S. Huo, D. X. Tan, Z. Liang, W. B. Zhang and Y. K. Zhang. (2003). Melatonin in Chinese Medicinal Herbs. *Life Sciences*, 73(1), 19-26.
- Chen, Q. Qi, W. B. Reiter, R. J. Wei, W. Wang, B. M. (2009). Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *J. Plant Physiol.*, 166, 324–328.
- Chinmayee, D., Anu M., Mahesh, B., Mary sheeba, A., Mini I., Swapna, T. S. (2014). A comparative study of heavy metal accumulation and antioxidant responses in *Jatropha curcas* L. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8 (7), 58-67.
- Cook, M. E., Morrow, H. (1995). Anthropogenic Sources of Cadmium in Canada. In National Workshop of Cadmium Transport into Plants (Centres Canadian Network of Toxicology ed.), Ottawa, Ontario, Canada.
- Dai, H. P., Shan, C. J., Lu, C., Jia, G. L., Wei, A. Z., Sa, W. Q. (2013). Response to cadmium tolerance, accumulation and translocation in *Populus canescens*, *Water Air Soil Pollut.*, 224, 1504-18.
- Davies, M. S., Francis, D. and Thomas, J. D. (1991). Rapidity of cellular changes induced by zinc in a zinc tolerant and non-tolerant cultivar of *Festuca rubra* L. *New Phytologist*, 117, 103-108.

- Devi Chinmayee, M., Anu, M. S., Mahesh, B., Mary sheeba, A., Swapna, T. S. (2014). A comparative study of heavy metal accumulation and antioxidant responses in *Jatropha curcas* L. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8 (3), 58-67.
- Dietz, K. J., Baier, M., Kramer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species are mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad, M.N.V., Hagemmeyer, J. (ed.): *Heavy Metal Stress in Plants: from Molecules to Ecosystem*. 79-97. Springer-Verlag, Berlin.
- Dinis T. C. P., Madeira V. M. C, Almeida L. M. (1994). Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys.*, 315, 161–169.
- Dolferus, R. (2014). To grow or not to grow: A stressful decision for plants. *Plant Sci.*, 229C, 247–261.
- Donghoon, S., Hunjoohg, K., Yangyik, S. (2011). Influence of defoliation by *Marssonina* blotch on vegetative growth and fruit quality in “Fuji”/M.9 apple tree. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.*, 29, 531–538.
- Duarte, B., Delgado, M., Calador, I. (2007). The role of citric acid in cadmium and nickel uptake and translocation, in *Halimione portulacoides*, *Chemosphere*, 69, 836-840.
- Dubbels, R., Reiter, R. J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H.W., Schloot, W. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Pineal Res*, 18, 28–31.
- Emsley, J. (2001). “Zinc”. *Nature’s building blocks: an A–Z guide to the elements*. Oxford University Press, Oxford, pp 499–505. ISBN 0-19-850340-7.
- Erland, L. A. E, Saxena, P. K., Murch S. J. (2017). Melatonin in plant signaling and behaviour. *Functional Plant Biology*, 45(2) 58-69.
- European Pharmacopoeia. (2005). Valerian root. *European Pharmacopoeia* 5, 2667.
- EU direktiva 86/278/EEC. Directive (86/278/EEC) on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture, Off. J. Eur. Comm. L181/6 (1986).
- Farinati, S., DalCorso, G., Bona, E. et al.. (2009). Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics*, 9, 4837–4850.

- Frankel, E. N., Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1925-1941.
- Frankel, E. N., Finley, J. W. (2008). How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 4901–4908.
- Fuhrberg, B., Balzer, I., Hardeland, R., Werner, A., Luning, K. (1996). The vertebrate pineal hormone melatonin is produced by the brown alga *Pterygophora californica* and mimics dark effects on growth rate in the light. *Planta*, 200, 125–131.
- García, R. and Báez, A. P. (2012). Atomic Absorption Spectroscopy. Muhammad Akhyar Farrukh (Ed.) Doi:10.5772/25925.
- Gawron, E., Hardeland, R. (1999). Photocatalytic destruction of melatonin by chlorophyll. In: Hardeland R, ed. Studies on antioxidants and their metabolites. *Goettingen: Cuvillier*, 95–98.
- Gomez, F. J. V., Raba, J., Cerutti, S., Silva, M. F. (2012). Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC–MS/MS from grape to bottle. *Journal of Pineal Research*, 52, 349–355.
- Gong, X., Shi, S., Dou, F., Song, Y., Ma, F. (2017). Exogenous Melatonin Alleviates Alkaline Stress in *Malus hupehensis* Rehd. by Regulating the Biosynthesis of Polyamines. *Molecules*, 22, 1542.
- Govender, J., Loos, B., Marais, E., Engelbrecht, A.M. (2014). Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: A review of the protective role of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 57, 367–380.
- Gulcin, I., Buyukokuroglu, M. E., Kufrevioglu, O. I. (2003). Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J. Pineal Res.*, 34, 278–281.
- Hambidge, K. M., Krebs, N. F. (2007). Zinc deficiency: a special challenge. *The Journal of nutrition*, 137, 1101–1105.
- Harb, A., Awad, D., Samarah, N. (2015). Gene expression and activity of antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) under controlled severe drought. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 109–116.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R. (2005). Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr. Metabolism*, 2, 22.

- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., Poeggeler, B. (2007). Melatonin in plants—focus on a vertebrate night hormone with cytoprotective properties. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 1, 32–45.
- Hardeland, R. (2008). Plants—sources of melatonin. In: Watson RR, Preedy VR, eds. *Botanical medicine in clinical practice*. Wallingford, UK: CABI, 752–760.
- Hardeland, R., Cardinali, D. P., Srinivasan, V.S., Brown, G. M., Spence, D. W., Pandi-Perumal, S. R. (2011). Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog. Neurobiol.*, 93, 350–384.
- Hasan, K, Ahammed, G. J., Yin, L., Shi, K., Xia, X., Zhou, Y., Yu, J., Zhou, J. (2015). Melatonin mitigates cadmium phytotoxicity through modulation of phytochelatin biosynthesis, vacuolar sequestration, and antioxidant potential in *Solanum lycopersicum* L. *Frontiers in Plant Science*, 6, 601.
- Hattori, A., Migitaka, H., Masayaki, I., Itoh, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, T., Reiter, R. J. (1995). Identification of melatonin in plant seed its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 35, 627–634.
- Hernandez-Ruiz, J., Cano, A., Arnao, M. B. (2004). Melatonin: Growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*, 220, 140–144.
- Hernandez-Ruiz, J., Cano, A., Arnao, M. B. (2005). Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species. *J. Pineal Res.*, 39, 137–142.
- Hernandez-Ruiz, J., Arnao, M. B. (2008). Distribution of melatonin in different zones of lupin and barley plants at different ages in the presence and absence of light. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 10567–10573.
- Hodžić, E., Balaban, M., Šuškalo, N., Galijašević, S., Hasanagić, D., Kukavica, B. (2019). Antioxidative response of *Melissa officinalis* L. and *Valeriana officinalis* L. leaves exposed to exogenous melatonin and excessive zinc and cadmium levels. *J. Serb. Chem. Soc.*, 84(1), 11–25.
- Holleman, A. F., Wiberg E., Wiberg N. (1985). Zink. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie* (91–100 ed.). Walter de Gruyter, Berlin, pp 1034–1041. ISBN 3-11-007511-3.
- Hornok, I. (1992). *Cultivation and processing of medicinal plants*. Akademiai Kiado, Budimpešta.
- Howatson, G., Bell, P. G., Tallent, J., Middleton, B., McHugh, M. P., Ellis, J. (2012). Effect of tart cherry juice (*Prunus cerasus*) on melatonin levels and enhanced sleep quality. *Eur. J. Nutr.*, 51, 909–916.

- Huang, X. and Mazza, G. (2011). Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218 (25), 3890–3899.
- Huttermann, A., Arduini, I., Gbold D. L. (1999). Metal pollution and Forest decline In: Prasad MNV. Hagemeyer J. (eds.) Heavy metal stress in plants. Springer Verlag. 253-272.
- Irina, I., Mohamed, G. (2012). Biological Activities and Effects of Food Processing on Flavonoids as Phenolic Antioxidants. *Advances in Applied Biotechnology*, ISBN: 978-953-307-820-5.
- Jackson, W. T. (1969). Regulation of mitosis. II. Interaction of isopropyl N-phenylcarbamate and melatonin. *Journal of Cell Science*, 5, 745–755.
- Jovičić, D. (2014). *Antioksidativni kapacitet, tolerantnost na oksidativni stres i životna sposobnost uljane repice*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu.
- Keller, C., Ludwig, C., Davoli, F., Wochele, J. (2005). Thermal treatment of metal-enriched biomass produced from heavy metal phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 3359–67.
- Kihara, S., Hartzler, D.A., Savikhin, S. (2014). Oxygen concentration inside a functioning photosynthetic cell. *Biophys. J.*, 106, 1882–1889.
- Kolar, J., Machackova, I., Illnerova, H., Prinsen, E., Van Dongen, W., Van Onckelen, H. A. (1995). Melatonin in higher plants determined by radioimmunoassay and liquid chromatography–mass spectrometry. *Biological Rhythm Research*, 26, 406.
- Kolar, J., Johnson, C. H., Machackova, I. (1999). Presence and possible role of melatonin in a short-day flowering plant, *Chenopodium rubrum*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 460, 391–393.
- Kolar, J. Machackova, I. (2005). Melatonin in higher plants: Occurrence and possible functions. *J. Pineal Res.*, 39, 333–341.
- Korkmaz, A., Deger, O., Yakup, C. (2014). Profiling the melatonin content in organs of the pepper plant during different growth stages. *Scientia Horticulturae*, 172, 242 – 247.
- Kostopoulou, Z., Therios, I., Roumeliotis, E., Kanellis, A.K., Molassiotis, A. (2015). Melatonin combined with ascorbic acid provides salt adaptation in *Citrus aurantium* L. seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, 86, 155–165.
- Krupa, Z., Oquist, G., Hunner, N. P. A. (1993). The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum*, 88, 626-630.

- Lampe, J. W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 475-490.
- Lazar, D. Murch, S. J., Beilby, M. J., Al Khazaaly, S. (2013). Exogenous melatonin affects photosynthesis in characeae *Chara australis*. *Plant Signal. Behavior*, 8, e23279.
- Lei, Q., Wang, L., Tan, D. X., Zhao, Y., Zheng, X. D., Chen, H., Li, Q. T., Zuo, B. X., Kong, J. (2013). Identification of genes for melatonin synthetic enzymes in “Red Fuji” apple (*Malus domestica* Borkh. cv. Red) and their expression and melatonin production during fruit development. *Journal of Pineal Research*, 55, 443–451.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y. (1958). Isolation of melatonin, a pineal factor that lightness melanocytes. *J. Am. Soc.*, 80, 2587.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79, 583-593.
- Li, Y., Yang, Y., Feng, Y., Yan, J., Fan, C., Jiang, S., Ou, Y. (2014). A review of melatonin in hepatic ischemia/reperfusion injury and clinical liver disease. *Ann. Med.*, 46, 503–511.
- Li, C. Wang, P. Wei, Z. Liang, D. Liu, C. Yin, L. Jia, D. Fu, M.; Ma, F. (2012). The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research*, 53, 298–306.
- Lim, P.O., Kim, H.J., Nam, H.G. (2007). Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 115–136.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Review*, 4(8), 118–126.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193(1), 265-75.
- Maharaj, D. S., Anoopkumar-Dukie, S., Glass, B. D., Antunes, E. M., Lack, B., Walker R. B., Daya, S. (2002). The Identification of the Uv Degradants of Melatonin and Their Ability to Scavenge Free Radicals. *Journal of Pineal Research*, 32 (4), 257-261.
- Maharia, R. S., Dutta, R. K., Acharya, R., Reddy, A. V. R. (2012). Correlation between heavy metal contents and antioxidant activities in medicinal plants grown in copper mining areas. *J Radioanal Nucl Chem.*, 294, 395–400.
- Malenčić, Đ., Kiprovski, B., Popović, M. T., Prvulović, D., Miladinović, J. A., Đordjević, V. B. (2010). Changes in antioxidant systems in soybean as affected by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Plant physiology and biochemistry*, 48, 903-908.

- Manchester, L. C., Tan, D-X., Reiter, R. J., Park, W., Monis, K., Qi, W. B. (2000). High levels of melatonin in the seeds of edible plants—possible function in germ tissue protection. *Life Science*, 67, 3023–3029.
- Marioni, F., Bertoli, A., and Pistelli, L. (2008). A straightforward procedure to biosynthesise melatonin using freshly chopped *Achillea millefolium* L. as reagent. *Phytochemistry Letters*, 2, 107–110.
- Marquez-Garcia, B., Fernandez-Recamales, M. A. and Francisco Cordoba, F. (2012). Effects of Cadmium on Phenolic Composition and Antioxidant Activities of *Erica andevalensis*. *Journal of Botany*, 6.
- Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Natarajan, M., Lopez-Burillo, S., Reiter, R. J. (2003). Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620, 139–150.
- McIntyre, I. M., Norman, T. R., Burrows, G. D., Armstrong, S. M. (1989). Human melatonin suppression by light is intensity dependent. *Journal of Pineal Research*, 6, 149–156.
- Mekhloufi, J., H. Vitrac, S. Yous, P. Duriez, D. Jore, M. Gardes-Albert and D. Bonnefont-Rousselot. (2007). Quantification of the Water/Lipid Affinity of Melatonin and a Pinoline Derivative in Lipid Models. *Journal of Pineal Research*, 42(4), 330-337.
- Meng, J. F., Xu, T. F., Wang, Z. Z., Fang, Y. L., Xi, Z. M., Zhang, Z. W. (2014). The ameliorative effects of exogenous melatonin on grape cuttings under water-deficient stress: Antioxidant metabolites, leaf anatomy, and chloroplast morphology. *J. Pineal Res.* 57, 200–212.
- Mitić, V. D., Stankov-Jovanović, V. P., Ilić, M. D., Jovanović, S. C., Nikolić-Mandić, S. D. (2013). Uticaj požara na sadržaj teških metala u biljkama i zemljištu. *Zaštita Materijala* 54, 1.
- Moffett, B. F., Nicholson, F. A., Uwakwe, N. C. (2003). Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microb Ecol.*, 43(1), 13–19.
- Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A. Meftahizade, H. (2010). *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of Medicinal Plant research*, 4(25), 2753-2759.
- Mosa, K.A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., Dhankher, O.P. (2016). Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Front. Plant Sci.*, 7, 303.

- Mukherjee, S., David, A., Yadav, S., Baluska, F., Bhatla, S. C. (2014). Salt stress-induced seedling growth inhibition coincides with differential distribution of serotonin and melatonin in sunflower seedling roots and cotyledons. *Physiol. Plant.*, 152, 714–728.
- Murch, S. J., Simmons, C. B., Saxena, P. K. (1997). Melatonin in feverfew and other medicinal plants. *Lancet*, 350, 1598–1599.
- Murch, S. J., Krishna Raj, S., and Saxena, P. K. (2000). Tryptophan Is a Precursor for Melatonin and Serotonin Biosynthesis in in Vitro Regenerated St. John's Wort (*Hypericum Perforatum* L. Cv. Anthos) Plants. *Plant Cell Reports*.
- Murch, S. J., Saxena, P. K. (2006). A melatonin-rich germplasma line of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Journal of Pineal Research*, 41, 284–287.
- Murch, S. J., Alan, A. R., Cao, J., Saxena, P. K. (2009). Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L. *Journal of Pineal Research*, 47, 277–283.
- Nag, P., Nag, P., Paul, A. K. and Mukherji, S. (1984). Toxic action of zinc on growth and enzyme activities of rice *Oryza sativa* L. seedlings. *Environmental Pollution*, 36, 45–59.
- Nathalieal, M., Hassinen, N. H. i sar. (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench)garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a btypemetallothionein gene. *Plant Physiol.*, 126, 1519–1526.
- Nunes, O. D., and R. D. Pereira. (2008). Regression of Herpes Viral Infection Symptoms Using Melatonin and Sb-73: Comparison with Acyclovir. *Journal of Pineal Research*, 44(4), 373-378.
- Obata, H., Umabayashi, M. (1997). Effects of Cadmium on Mineral Nutrient Concentrations in Plants Differing in Tolerance for Cadmium. *Journal of plant nutrition*, 20(1), 97-105.
- Odaci, E., Kaplan, S. (2009). Chapter 16: Melatonin and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.*, 87, 317–335.
- Okazaki, M., Higuchi, K., Hanawa, Y., Shiraiwa, Y., Ezura, H. (2009). Cloning and characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* cDNA arylalkylamine N-acetyltransferase and its use in the genetic engineering of melatonin content in the Micro-Tom tomato. *Journal of Pineal Research*, 46, 373–382.
- Oladi, E., Mohamadi, M., Shamspur, T., Mostafavi, A. (2014). Spectrofluorimetric determination of melatonin in kernels of four different *Pistacia* varieties after ultrasound-assisted solid-liquid extraction. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 132, 326–329.

- Ozyurek, M., Guclu, K., Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 4.
- Pablos, M. I., Reiter, R. J., Ortiz, G. G., Guerrero, J. M., Agapito, M., T., Chuang, J. I. (1998). Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int.*, 32, 69–75.
- Pahlow, M. (1989). *Velika knjiga ljekovitog bilja*. Grafički zavod Hrvatske, Zagreb.
- Pang, S.F. (1985). Melatonin concentrations in blood and pineal gland. *Pineal Res. Rev.*, 3, 115–160.
- Paredes, S. D., Korkmaz, A., Manchester, L. C., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2009). Phytomelatonin: a review. *Journal of Experimental Botany*, 60, 57–69.
- Park, S., Lee, D.E., Jang, H., Byeon, Y., Kim, Y.S., Back, K. (2013). Melatonin-rich transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress. *Journal of Pineal Research*, 54, 258–263.
- Paul, M. A., Love, R. J., Hawton, A., Arendt, J. (2015). Sleep and the endogenous melatonin rhythm of high arctic residents during summer and winter. *Physiol. Behaviour*, 141, 199–206.
- Pelagio-Flores, R., Munoz-Parra, E., Ortiz-Castro, R., Lopez-Bucio J. (2012). Melatonin regulates Arabidopsis root system architecture likely acting independently of auxin signaling. *Journal of Pineal Research*, 53, 279–288.
- Pence, N. S., Larsen, P. B., Ebbs, S. D., i sar. (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97, 4956–4960.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15–39.
- Poeggeler, B., Balzer, I., Hardeland, R., Lerchl, A. (1991). Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften*, 78, 268–269.
- Posmyk, M. M., Janas, K. M. (2008). Melatonin in plants. *Acta Physiol. Plant*, 31, 1-11.
- Posmyk, M. M., Bałabusta, M., Wiczorek, M., Sliwinska, E., Janas, K. M. (2009). Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress. *Journal of Pineal Research*, 46 (2), 214–223.

- Posmyk, M. M., Kuran, H., Marciniak, K., Janas, K. M. (2008). Presowing seed treatment with melatonin protects red cabbage seedlings against toxic copper concentrations. *Journal of Pineal Research*, 45, 24–31.
- Pothinuch, P., Tongchitpakdee, S. (2011). Melatonin contents in mulberry (*Morus* spp.) leaves: Effects of sample preparation, cultivar, leaf age and tea processing. *Food chem.*, 128.
- Prasad, A.S. (2008). Zinc in human health: effect of zinc on immune Cells. *Molecular Medicine*, 14(5–6), 353–357.
- Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- Rastgoo, L., Alemzadeh, A. (2011). Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. *Australian Journal of Crop Science*, 5 (4): 375-383.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180, 169–181.
- Razack, S., Kumar, K. H., Nallamuthu, I., Naika, M., Khanum, F. (2015). Antioxidant, Biomolecule Oxidation Protective Activities of *Nardostachys jatamansi* DC and Its Phytochemical Analysis by RP-HPLC and GC-MS. *Antioxidants*, 4.
- Reichman, S. M. (2002). The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. *Australian minerals & energy environment foundation*.
- Reiter, R. J. (1986). Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. *Journal of Neural Transmission Supplement*, 21, 35–54.
- Reiter, R. J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its physiological interactions. *Endocrine Review*, 12, 151–181.
- Reiter, R. J. and S. J. Kim. (1999). *Phytochemicals: Melatonin*. *Encyclopedia of Food Science & Technology*. F. J. Francis. New York, Wiley: 1918-1922.
- Reiter, R. J., D. X. Tan and M. D. Maldonado. (2005b). Melatonin as an Antioxidant: Physiology Versus Pharmacology. *Journal of Pineal Research*, 39, 215-216.
- Reiter, R. J., Manchester, L. C., Tan, D. X. (2005). Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition*, 21, 920–924.

- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Somopoulos, A. P., Maldonado, M. D., Flores, L. J., Terron, M. P. (2007). Melatonin in edible plants (phytomelatonin): identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Rev. Nutr. Diet.*, 97, 211–230.
- Reiter, R. J., Manchester, L. C., Tan, D. X. (2010). Neurotoxins: Free radical mechanisms and melatonin protection. *Curr Neuropharmacol.*, 8, 194–210.
- Reiter, R. J., Tamura, H., Tan, D. X., Xu, X. P. (2014). Melatonin and the circadian system: Contributions to successful female reproduction. *Fertil. Steril.*, 102, 321–328.
- Reiter, R. J., Xu, D. X., Zhou, Z., Coelho Cruz, M. H., Lorena Fuentes-Broto L., Galano, A. (2015). Phytomelatonin: Assisting Plants to Survive and Thrive. *Molecules*, 20, 7396–7437.
- Rezvania, M., Zaefarianb, F., Miransaric M., Ali Nematzadehb, G. (2012). Uptake and translocation of cadmium and nutrients by *Aeluropus littoralis*. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 58, 12.
- Romero, A., Ramos, E., de Los Ríos, C., Egea, J., del Pino, J., Reiter, R. J. (2014). A review of metal-catalyzed molecular damage: protection by melatonin. *J. Pineal Res.*, 56, 343–370.
- Rosen, J., Than, N. N., Koch, D., Poeggeler, B., Laatsch, H., and Hardeland, R. (2006). Interactions of Melatonin and Its Metabolites with the Abts Cation Radical: Extension of the Radical Scavenger Cascade and Formation of a Novel Class of Oxidation Products, C2-Substituted 3-Indolinones. *Journal of Pineal Research*, 41(4), 374–381.
- Rouessac, F., Rouessac, A. (2007). *Chemical analysis*. Second edition. John Wiley & Sons, Ltd. 63–64.
- Savić, D. (2008). Optimization of Microwave-Assisted Acid Digestion Method for Determination of Trace Elements in Coal and Coal Fly Ash. *Masters Theses & Specialist Projects*. Western Kentucky University. Paper 4.
- Sarropoulon, V. N., Therios, I. N., Dimassi-Theriou, K. N. (2012). Melatonin promotes adventitious root regeneration in in vitro shoot tip explants of the commercial sweet cherry rootstocks CAB-6P (*Prunus cerasus* L.), Gisela 6 (*P. cerasus* × *P. canescens*), and MxM60 (*P. avium* × *P. mahaleb*). *Journal of Pineal Research*, 52, 38–46.
- Sauer, M., Robert, S., Kleine-Vehn, J. (2013). Auxin: Simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2565–2577.

- Schmidt U. (2003). Enhancing phytoextraction: the effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *J Environ Quality*, 32, 1939–54.
- Schutzendubel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeldheyser, R., Godbold, D., Polle A. (2001). Cadmium induced changes in antioxidative system. H₂O₂ content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. *Plant Physiol.*, 127, 887-898.
- Schutzendubel, A., Nikolova, P., Rudolf, C., Polle A. (2002). Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus x canescens* roots. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 577-584.
- Seregin, I. V., Kozhevnikova, A. D. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants, Russ. *Journal of Plant Physiology*, 53, 257-277.
- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., Dubey, R. S. (2001). Effects of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 161, 1135-1144.
- Shi, H., Jiang, C., Ye, T. Tan, D.X., Reiter, R.J., Zhang, H., Liu, R., Chan, Z. (2015). Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin. *Journal of Experimental Botany*, 66, 681–694.
- Shida, C. S., Castrucci A. M. L. Lamyfreund, M. T. (1994). High Melatonin Solubility in Aqueous-Medium. *Journal of Pineal Research*, 16(4), 198-201.
- Siddiqui, S., Meghvansi, M., Wani, M.& Jabee, F. (2009). Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 531–536.
- Soler-Rivas, C., Espin, J. C., Wichers, H. J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 11, 330-338.
- Stefanovic, V. Ž. (2012). *Uticaj genotipa i lokaliteta na dinamiku akumulacije teških metala u vegetativnim organima pšenice*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni Fakultet, Beograd.
- Štajner D., Popović, B. (2008). *Oksidativni stres kod biljaka*, Novi Sad.
- Steger, P. W., Sombra, L. L., Messina, G, Martinez, L. D., Silva, M. F. (2010). Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase. *Electrophoresis*, 31, 2242–2248.
- Syvertsen, J. P., Garcia-Sanchez, F. (2014). Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. *Environ. Experimental Botany*, 103, 128–137.

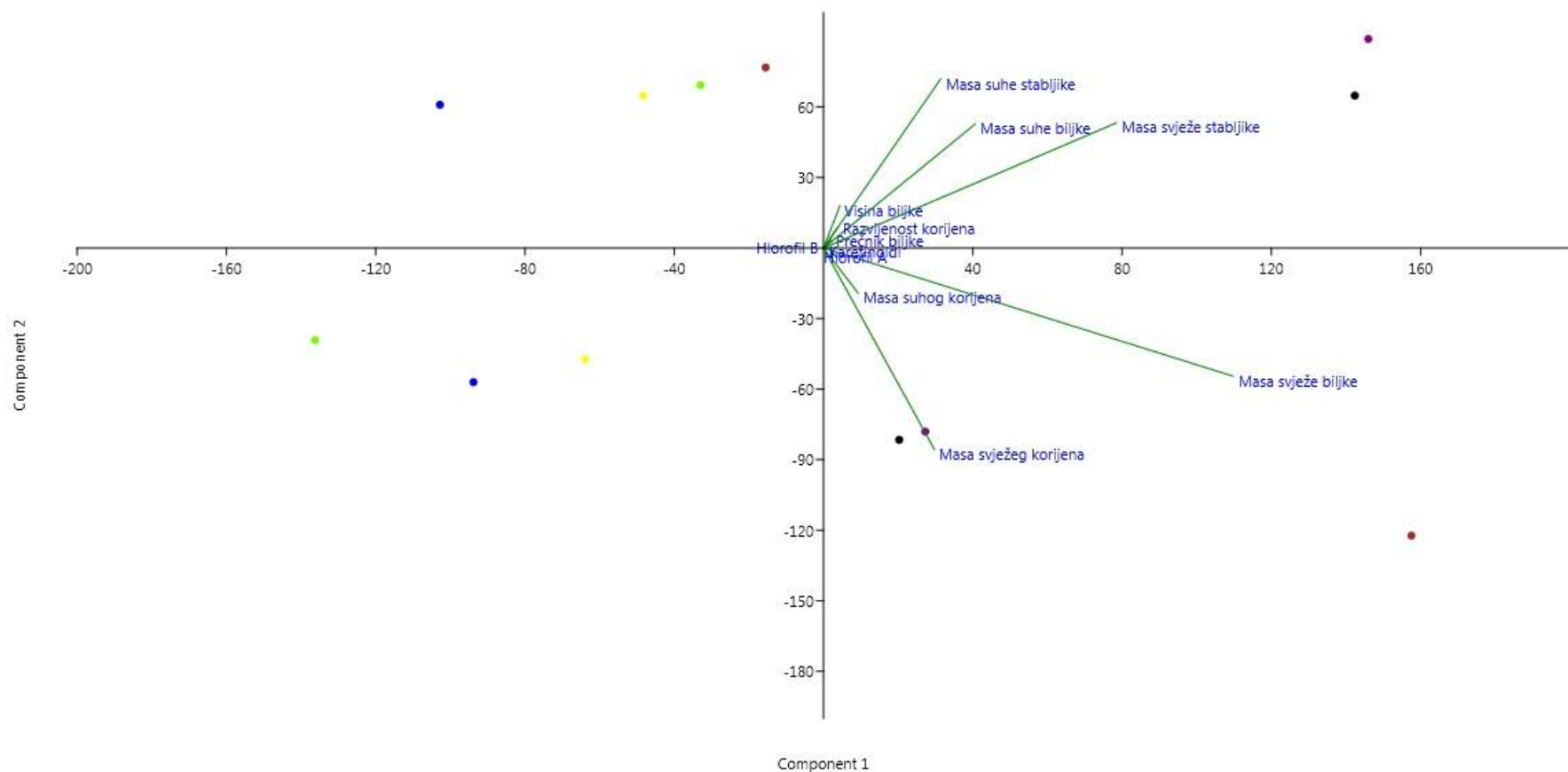
- Tal, O., Haim, A., Harel, O., Gerchman, Y. (2011). Melatonin as an antioxidant and its semi-lunar rhythm in green macroalga *Ulva* sp. *The Journal of Exp. Botany*, 62, 1903–1910.
- Tan, D. X., Chen, L. D., Poeggeler, B., Manchester, L., Reiter, R. J. (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Journal*, 1, 57–60.
- Tan, D. X., Reiter, R. J., Chen, L. D., Poeggeler, B., Manchester, L. C., Barlow-Walden, L. R. (1994). Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *J Carcinog.*, 15, 215–218.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Sainz, R. M., Reiter, R. J. (2003). Melatonin: a hormon, a tissue factor, an autocoid, a paracoid and an antioxidant vitamin. *J. Pineal Res.*, 34, 75–78.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Helton, P., Reiter, R. J. (2007a). Phyto-remediative capacity of plants enriched with melatonin. *Plant Signaling and Behavior*, 2, 514–516.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Prado, F. M., Reiter, R. J. (2007b). Novel rhythms of *N*1-acetyl-*N*2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: Importance for phytoremediation. *FASEB J.*, 21, 1724–1729.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Sanchez-Barcelo, E., Mediavilla, M. D., Reiter, R. J. (2010). Significance of high levels of endogenous melatonin in mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Current Neuropharmacology*, 8, 162–167.
- Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., Reiter, R. J. (2012). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *Journal of Experimental Botany*, 63, 577–597.
- Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Galano, A., Reiter, R. J. (2014). Cyclic-3-hydroxymelatonin (C₃HOM), a potent antioxidant, scavenges free radicals and suppresses oxidative reactions. *Current Medicinal Chemistry*, 21, 1557–1565.
- Tang, Y., Lin, L., Xie, Y., Liu, J., Sun, G., Li, H., Liao, M., Wang, Z., Liang, D., Xia, H., Wang, X., Zhang, J., Liu, Z., Huang, Z., He, Z., Tu, L. (2018). Melatonin Affects the Growth and Cadmium Accumulation of *Malachium aquaticum* and *Galinsoga parviflora*. *International Journal of Phytoremediation*, 20.
- Tekbas, O. F., Ogur, R., Korkmaz, A., Kilic A., and Reiter, R. J. (2008). Melatonin as an Antibiotic: New Insights into the Actions of This Ubiquitous Molecule. *Journal of Pineal Research*, 44(2), 222-226.

- Tengattini, S., Reiter, R. J., Tan, D. X., Terron, M. P., Rodella, L. F., Rezzani, R. (2008). Cardiovascular Diseases: Protective Effects of Melatonin. *Journal of Pineal Research*, 44(1), 16-25.
- Toplak – Galle, K. (2005). *Domaće ljekovito bilje*. Mozaik knjiga, Zagreb.
- Tran, T. A., Popova, L. P. (2013). Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany*, 37, 1-13.
- Trudić, B., Kebert, M., Popović, B. M., Štajner, D., Orlović, S., Galović V. (2012). The level of oxidative stress in poplars due to heavy metal pollution in soil. *Baltic forestry*, 18, 214-227.
- Turk, H., Erdal, S., Genisel, M., Atici, O., Demir, Y., Yanmis, D. (2014). The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings. *Plant growth Regulation*, 74(2):139-152.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. D. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1161 – 1208.
- Van Tassel, D. L., O'Neill, S. D. (2001). Putative regulatory molecules in plants: evaluating melatonin. *Journal of Pineal Research*, 31, 1–7.
- Venegas, C. Garcia, J. A. Escames, G. Ortiz, F. Lopez, A. Doerrier, C. Garcia-Corzo, L. Lopez, L. C. Reiter, R. J. Acuna-Castroviejo, D. (2012). Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Journal of Pineal Research*, 52, 217–227.
- Vitalini, S., Gardana, C., Zanzotto, A., i sar. (2011). The presence of melatonin in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry tissues. *Journal of Pineal Research*, 51, 331–337.
- Wagner, G. (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. In: Sparks DL (ed.). *Advances in Agronomy*. Newark, USA: Academic Press, 173–212.
- Wang, P., Sun, X., Li, C., Wei, Z., Liang, D., Ma, F. (2013a). Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. *Journal of Pineal Research*, 54, 292–302.
- Wang, P., Sun, X., Chang, C., Feng, F., Liang, D., Cheng, L., Ma, F. (2013b). Delay in leaf senescence of *Malus hupehensis* by long-term melatonin application is associated with its regulation of metabolic status and protein degradation. *Journal of Pineal Res.*, 55, 424–434.

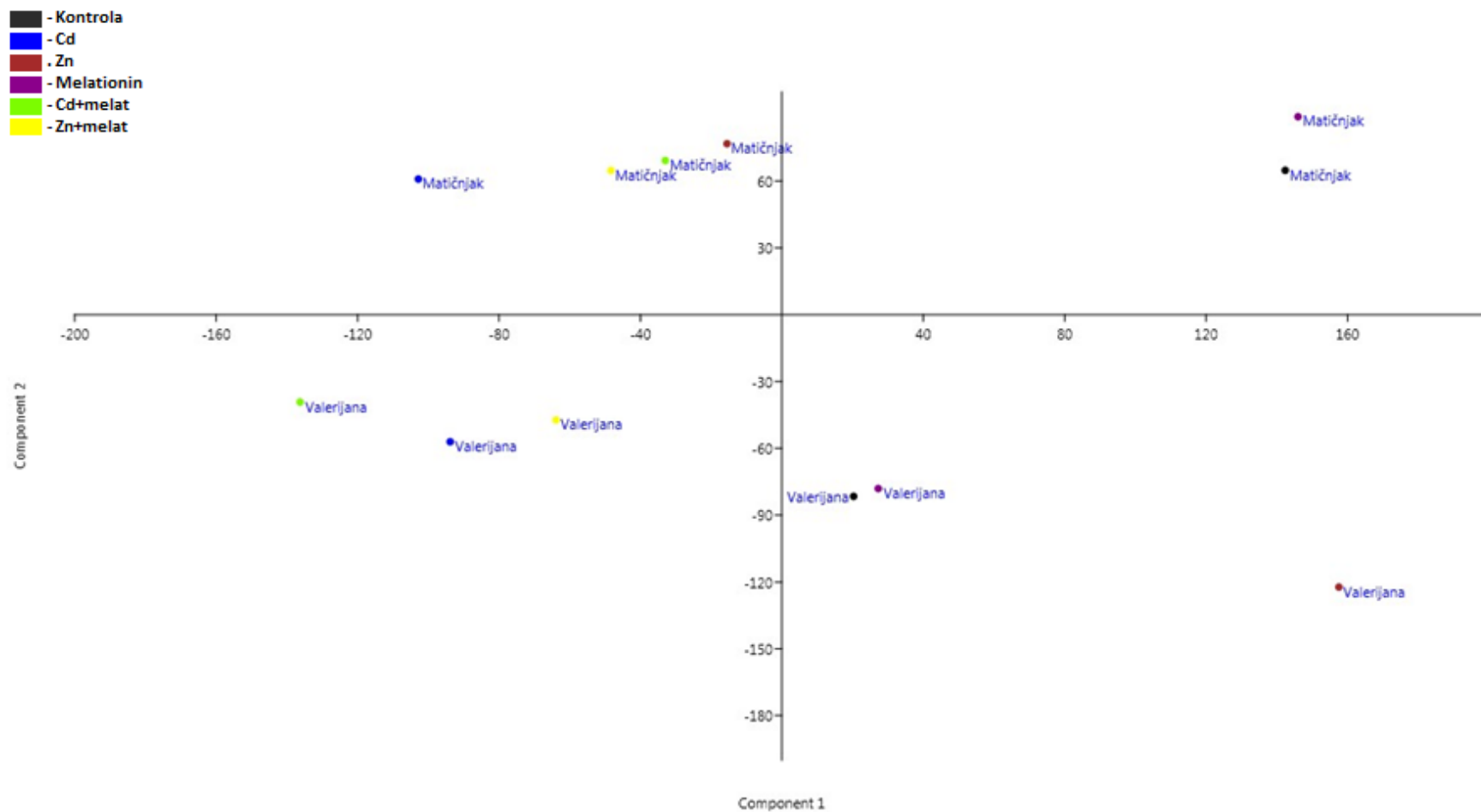
- Wang, P., Yin, L., Liang, D., Li, C., Ma, F., Yue, Z. (2012). Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: Toward regulating the ascorbate-glutathione cycle. *Journal of Pineal Research*, 53, 11–20.
- White, P. J., Broadley, M. R. (2011). Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. *Frontiers in Plant Science*, 2, 1–11.
- Wu, Y. H., Swaab, D. F. (2005). The Human Pineal Gland and Melatonin in Aging and Alzheimer's Disease. *Journal of Pineal Research*, 38(3), 145-152.
- Xia, H., Ni, Z., Pan, D. (2017). Effects of exogenous melatonin on antioxidant capacity in *Actinidia* seedlings under salt stress. *Earth and Environmental Science*, 94.
- Xu, X.D., Sun, Y., Guao, X., Sun, B., Zhang, J. (2010). Effects of exogenous melatonin on ascorbate metabolism system in cucumber seedlings under high temperature stress. *The Journal of applied ecology*, 21, 2580–2586.
- Xu, Y., Li, Y., Maffucci, K. G., Huang, L., Zeng, R. (2017). Analytical Methods of Phytochemicals from the Genus *Gentiana*. *Molecules*, 22, 2080.
- Xu, L. , Yue, Q., Bian, F., Zhai, H., Yao, Y. (2018). Melatonin Treatment Enhances the Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Red Wine. *Horticultural Plant Journal*, S2468-0141.
- Yin, L., Wang, P., Li, M., Ke, X., Li, C., Liang, D., Wu, S., Ma, X., Li, C., Zou, Y. i sar. (2013). Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to *Marssonina* apple blotch. *Journal of Pineal Research*, 54, 426–434.
- Yun, A. J., Bazar, K. A., Lee, P. Y. (2004). Pineal Attrition, Loss of Cognitive Plasticity, and Onset of Puberty During the Teen Years: Is It a Modern Maladaptation Exposed by Evolutionary Displacement? *Medical Hypotheses*, 63(6), 939-950.
- Zeremski, T. (2005). *Određivanje sadržaja teških metala i njihovog oblika vezivanja u černozeu Vojvodine metodom sekvencijalne ekstrakcije*. Magistarski rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Zhang, N., Zhao, B., Zhang, H. J. i sar. (2013). Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Pineal Research*, 54, 15–23.
- Zhang, N., Zhang, H. J., Zhao, B., Sun, Q. Q., Cao, Y. Y., Li, R., Wu, X. X., Weeda, S., Li, L., Ren, S. i sar. (2014). The RNA-seq approach to discriminate gene expression profiles in response to melatonin on cucumber lateral root formation. *Journal of Pineal Res.*, 56, 39–50.

- Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., Guo, Y-D. (2015). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of Experim. Botany*, 66 (3), 647–656.
- Zhao, Y., Tan, D.X., Lei, Q., Chen, H., Wang, L., Li, Q.T., Gao, Y., Kong, J. (2013). Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry. *Journal of Pineal Research*, 55, 79–88.
- Zhou, C., Liu, Z., Zhu, L., Ma, Z., Wang, J., Zhu, J. (2016). Exogenous Melatonin Improves Plant Iron Deficiency Tolerance via Increased Accumulation of Polyamine-Mediated Nitric Oxide. *International Journal of Molecular Science*, 17(11), 1777.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Science*, 6, 66–71.
- Zhuang, P., Yang, Q. W., Wang, H. B., Shu, W. S. (2007). Phytoextraction of heavy metals by eight plant species. *Water Air Soil Pollut.*, 184, 235–242.
- Zohar, R., Izhaki, I., Koplovich, A., Ben-Shlomo, R. (2011). Phytomelatonin in the leaves and fruits of wild perennial plants. *Phytochemistry Letters*, 4, 222–226.
- Zuo, Z., Sun L., Wang, T., Miao, P., Zhu, X., Liu, S., Song, F., Mao, H., Li, X. (2017). Melatonin Improves the Photosynthetic Carbon Assimilation and Antioxidant Capacity in Wheat Exposed to Nano-ZnO Stress. *Molecules*, 22, 1727.
- Živanovic M. (2010). *Teški metali u zemljištu i njihov uticaj na biljke*. Build. 14:1-6.

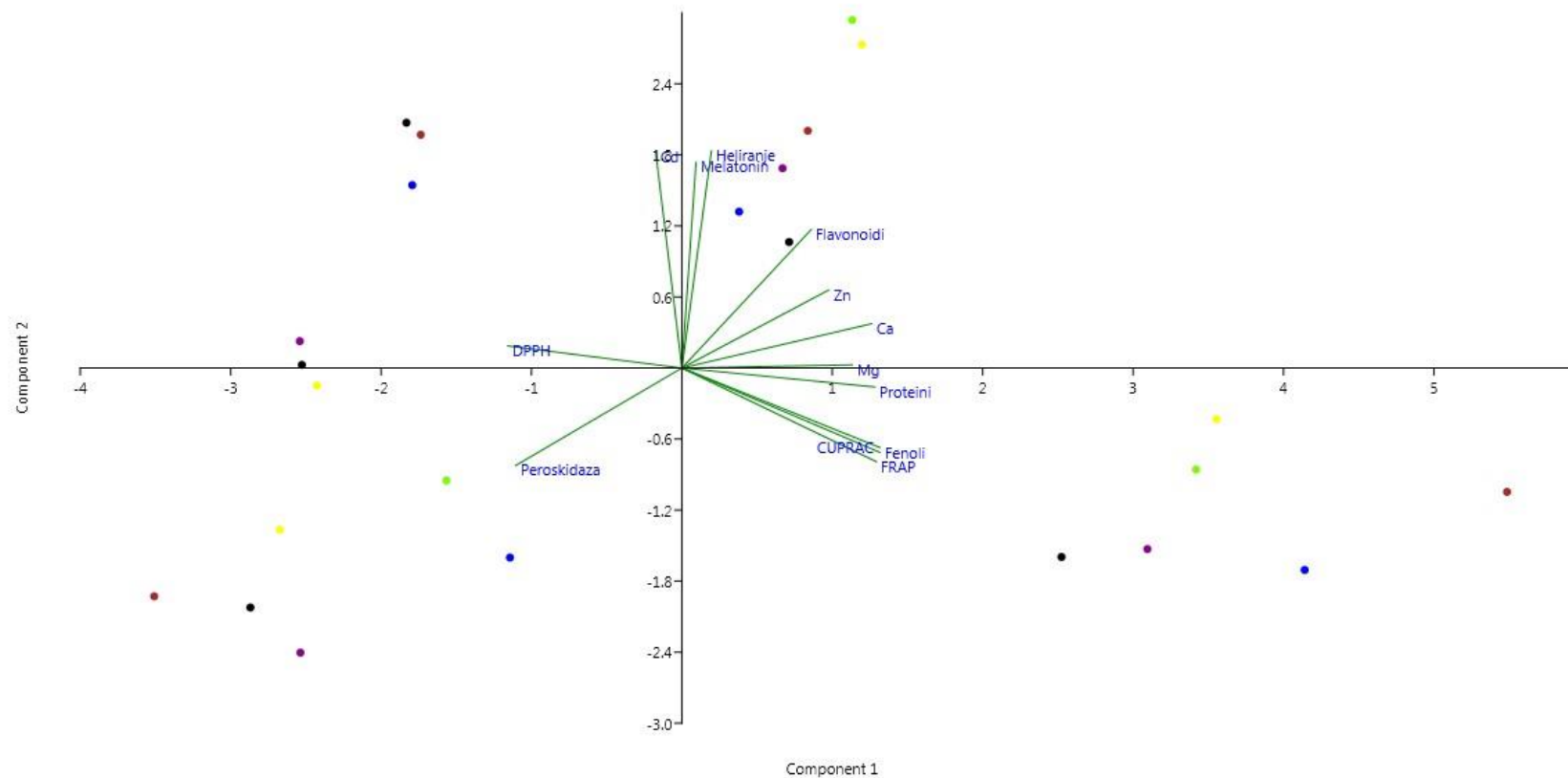
PRILOG 1



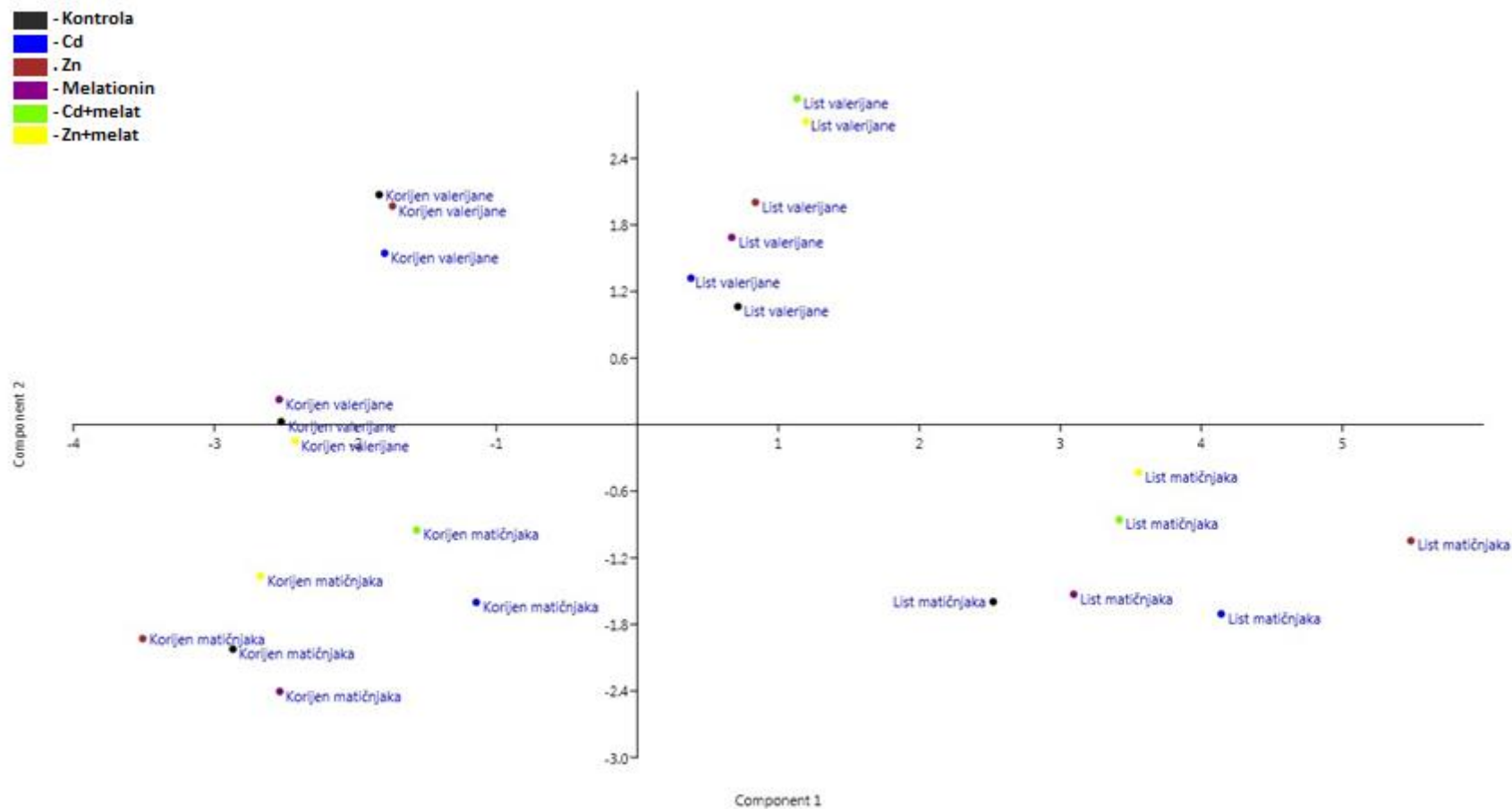
Grafikon 1. Grupisanje i međuodnosi 12 morfometrijskih i fizioloških varijabli analiziranih kod 12 kombinacija modaliteta biljne vrste i hemijskog spoja



Grafikon 2. Razdvajanje 12 kombinacija modaliteta biljnog organa i hemijskog spoja na osnovu analize 12 morfometrijskih i fizioloških parametara analizom glavnih komponenti



Grafikon 3. Grupisanje i međuodnosi 13 hemijskih varijabli analiziranih kod 24 kombinacije modaliteta biljnog organa i hemijskog spoja



Grafikon 4. Razdvajanje 24 kombinacije modaliteta biljnog organa i hemijskog spoja na osnovu analize 13 hemijskih parametara analizom glavnih komponenti

Biografija autora

Elvisa Hodžić je rođena u Bihaću, 31. januara 1984. godine. Biotehnički fakultet Univerziteta u Bihaću, odsjek Prehrambeni, smjer Prehrambena tehnologija, upisala je školske 2002/03. godine. Diplomirala je 2007. godine sa prosječnom ocjenom, 8,11 i ocjenom 10 na diplomskom radu.

Magistarske studije upisala je na Prirodno-matematičkom fakultetu školske 2007/08. godine, a magistarski rad pod nazivom „Mehanističke i kompjuterske studije reaktivnosti laktoperoksidaznog sistema“ odbranila je 03. jula 2012. godine i stekla zvanje magistar hemijskih nauka, smjer Analitička hemija.

Od aprila 2008. godine zaposlena je na Biotehničkom fakultetu Univerziteta u Bihaću kao asistent iz oblasti Analitičke hemije.

Učestvovala je na kraćem studijskom boravku na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i Univerzi v Novi Gorici, Laboratoriji za istraživanja u okolišu (Nova Gorica, Slovenija), u sklopu bilateralnog projekta 2016. godine.

Objavila je nekoliko naučnih radova u međunarodnim časopisima i uzela učešće u brojnim međunarodnim konferencijama.

UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



РЕПУБЛИКА СРПСКА
УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
Природно-математички факултет
Број: 19-957/19
Датум: 18.04.2019 год.
БАЊА ЛУКА

IZVJEŠTAJ o ocjeni urađene doktorske disertacije

I PODACI O KOMISIJI

- 1) Nastavno-naučno vijeće Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci je na 210. sjednici održanoj 13.03.2019. godine donijelo Odluku broj 19/3.591/19 kojom je imenovalo Komisiju za pregled, ocjenu i odbranu urađene doktorske disertacije. Komisija je dužna da u roku od 60 dana napiše Izvještaj o ocjeni urađene doktorske disertacije "Kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L.", kandidatkinje mr Elvise Hodžić
- 2) Komisija:
- Dr Biljana Kukavica, redovni profesor, uža naučna oblast *Biohemija i molekularna biologija*, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **predsjednik**
 - Dr Semira Galijašević, vanredni profesor, uža naučna oblast *Opšta hemija*, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu i vanredni profesor, uža naučna oblast *Medicinska hemija i biohemija*, Sarajevo School of Science and Technology, Medical School, mentor, **član**
 - Dr Milica Balaban, vanredni profesor, uža naučna oblast *Organska hemija*, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, mentor, **član**
 - Dr Halid Makić, vanredni profesor, uža naučna oblast *Analitička hemija* i uža naučna oblast *Biohemija*, Biotehnički fakultet Univerziteta u Bihacu, **član**
 - Dr Saša Zeljković, vanredni profesor, uža naučna oblast *Neorganska i nuklearna hemija*, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **član**
- 1) Navesti datum i organ koji je imenovao komisiju;
- 2) Navesti sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, naučno-nastavnog zvanja, naziva uže naučne oblasti za koju je izabran u zvanje i naziva univerziteta/fakulteta/instituta na kojem je član komisije zaposlen.

II PODACI O KANDIDATU

- 1) Elvisa, Irfan, Hodžić
- 2) 31.01.1984. godine, Bihać, Bosna i Hercegovina
- 3) Univerzitet u Sarajevu, Prirodno-matematički fakultet, Odsjek za hemiju, magistar hemijskih nauka-smjer Analitička hemija
- 4) Prirodno-matematički fakultet, „Mehanističke i kompjuterske studije reaktivnosti laktoperoksidaznog sistema“, Hemijske nauke, 03.07.2012. godine
- 5) Hemijske nauke
- 6) Postupak za sticanje naučnog stepena doktora nauka započet je 2015. godine, prema odredbama Člana 148. Zakona o visokom obrazovanju, *Studijski program hemija*
- 1) Ime, ime jednog roditelja, prezime;
- 2) Datum rođenja, opština, država;
- 3) Naziv univerziteta i fakulteta i naziv studijskog programa akademskih studija II ciklusa, odnosno

poslijediplomskih magistarskih studija i stečeno stručno/naučno zvanje;
 4) Fakultet, naziv magistarske teze, naučna oblast i datum odbrane magistarskog rada;
 5) Naučna oblast iz koje je stečeno naučno zvanje magistra nauka/akademsko zvanje mastera;
 6) Godina upisa na doktorske studije i naziv studijskog programa.

III UVODNI DIO OCJENE DOKTORSKE DISERTACIJE

1) „Kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L.”

2) 02.03.2016. Senat Univerziteta u Banjoj Luci (Odluka broj: 02/04-3.536-81/16)

3) Poglavlje „UVOD” je napisano na dvije stranice (str. 1 i 2) i sadrži opis melatonina, kao i kratak osvrt na njegovu ulogu u živom svijetu i na značaj u regulisanju skoro svih faza rasta i razvoja biljaka i njegovu uključenost u odbranu biljaka od različitih vrsta biotičkog i abiotičkog stresa.

Poglavlje „CILJ ISTRAŽIVANJA” je napisan na jednoj stranici (str. 3) i sadrži jasno formulisane ciljeve istraživanja.

Kandidatkinja je u poglavlju „PREGLED LITERATURE” (33 stranice; str. 6-39), jasno opisala karakteristike melatonina (strukturu, mehanizam djelovanja) (str. 6-8), otkriće melatonina u biljnim tkivima i njegove koncentracije u pojedinim biljnim organima (str. 9-15). Predstavljen je sveobuhvatan literaturni pregled o uticaju teških metala na metabolizam biljaka, sa posebnim osvrtom na jone kadmijuma i cinka (str. 16-21), te oksidativni stres koji nastaje kao posljedica djelovanja metala na metabolizam biljaka (str. 21-22). Opisana je uloga melatonina u zaštiti biljaka od stresa (str. 23-30) i uticaj melatonina na morfološka svojstva biljaka (str. 32-34). Karakteristike dvije biljne vrste korištene u istraživanju su opisane na str. 35-39.

Poglavlje „MATERIJAL I METODE RADA” (30 stranica; str. 40-70) sadrži: opis uslova u kojima je eksperiment postavljen i uslove gajenja biljaka (str. 40-43), uzorkovanje biljaka (str. 44), navedene korištene hemikalije i reagense (str. 45), opis ekstrakcije i metode mjerenja melatonina u biljnim tkivima tečnom hromatografijom visokih performansi sa različitim detektorima, HPLC-FLD i HPLC-DAD (str. 46-49), opis pripreme biljnog materijala mikrotalasnom digestijom i određivanje sadržaja teških metala (str. 50-56). Poglavlje materijala i metoda rada sadrži i odjeljak koji opisuje pripremu metanolnih ekstrakata, te *in vitro* testove za mjerenje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata (str. 56-58), kako slijede: Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (Soler-Rivas i sar., 2000, str. 59), Određivanje sposobnosti redukcije ekstrakata FRAP testom (Ferric Reducing/Antioxidant Power) (Benzie i Strain, 1999, str. 60), određivanje sposobnosti redukcije Cu(II) jona (CUPRAC test) (Apak i sar., 2007, str. 61), Određivanje sadržaja ukupnih fenola spektrofotometrijski reakcijom po Folin-Ciocalteu (TPC – Total Phenolic Content) (Singleton i sar., 1999, str. 64), Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (Chang i sar., 2002, str. 64), te sposobnost heliranja teških metala (str. 66). Detaljno su opisane metode za ekstrakciju solubilnih proteina iz biljnog materijala i određivanje koncentracije proteina (str. 67), spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti peroksidaza (str. 69). Dat je opis nativne elektroforeze koja je korištena za razdvajanje izoformi superoksid dismutaza (SOD) (str. 69). Posljednji odjeljak u poglavlju „Materijal i metode rada” opisuje program korišten za denzitometrijsku obradu gelova sa razdvojenim SOD izoformama (TotalLab) i program za statističku obradu dobijenih rezultata (str. 70).

Poglavlje „REZULTATI I DISKUSIJA” (55 stranica; str. 71-126) sadrži pregled dobijenih rezultata predstavljenih u tabelama i grafički. Prvi odjeljak prikazuje fizičko-hemijska svojstva zemljišta, te meterološke uslove tokom postavljanja eksperimenta (str. 71). U sljedećem odjeljku predstavljeni su rezultati o sadržaju melatonina u biljnim organima matičnjaka i valerijane dobijeni nakon mjerenja HPLC-FLD tehnikom (str. 72-80). Određen je sadržaj teških metala u biljnim organima tehnikom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS) (str. 81-86). Prikazani su rezultati djelovanja melatonina i teških metala na morfološke karakteristike biljaka, te na sadržaj biljnih pigmenta (str. 87-96). Analiza glavnih komponenti morfometrijskih i fizioloških parametara urađena je na osnovu korelacijskih matrica (str. 97-98). U ovom poglavlju prikazani su i rezultati uticaja melatonina i teških metala na sadržaj makroelemenata u ispitivanim biljnim organima (str. 99-101), te na sadržaj fenola i flavonoida (str. 102-106). Predstavljeni su i rezultati uticaja melatonina i teških metala na sadržaj solubilnih proteina i aktivnost antioksidativnih enzima (peroksidaza i superoksid dismutaza)

u listovima i korijenu matičnjaka i valerijane (str. 107-113) i rezultati uticaja melatonina i teških metala na antioksidativnu aktivnost ekstrakata listova i korijena matičnjaka i valerijane po svim predviđenim metodama mjerenja antioksidativne aktivnosti (str. 113-119). Određena je sposobnost biljnih ekstrakata da heliraju teške metale (Cd i Zn) (str. 121-123), te analiza glavnih komponenti praćenih hemijskih parametara (str. 123-126). Svi dobijeni rezultati su upoređeni sa relevantnim literaturnim podacima.

Poglavlje „ZAKLJUČAK” (5 stranica; str. 127-131) sadrži pravilno i sistemski navedene zaključke ovog istraživanja, uz jasno navođenje njihovog teorijskog i praktičnog značaja za ispitivanu oblast. Poglavlje „LITERATURA” (13 stranica; str. 132-149) sadrži 212 abecedno navedenih referenci.

4) Disertacija sadrži 147 numerisanih stranica računarski obrađenog teksta, 23 tabele i 46 slika. Citirano je 212 referenci. Disertacija obuhvata sedam poglavlja: Uvod, Cilj istraživanja, Pregled literature, Materijal i metode rada, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura.

1) Naslov doktorske disertacije;

2) Vrijeme i organ koji je prihvatio temu doktorske disertacije

3) Sadržaj doktorske disertacije sa straničenjem;

4) Istaći osnovne podatke o doktorskoj disertaciji: obim, broj tabela, slika, šema, grafikona, broj citirane literature i navesti poglavlja.

IV UVOD I PREGLED LITERATURE

1) Znan broj dosadašnjih istraživanja ukazao je na značaj melatonina u regulisanju skoro svih faza rasta i razvoja biljaka (od klijanja sjemena do starenja listova), kao i u odbranu od različitih vrsta biotičkog i abiotičkog stresa poput suše, promjene saliniteta, ekstremno niskih ili visokih temperatura, raznih patogenih i hemijskih agenasa. Kao faktori abiotičkog stresa teški metali narušavaju osnovne metaboličke procese dovodeći do anatomskih, morfoloških, fizioloških i biohemijskih poremećaja u biljci. Metali svoje toksično djelovanje ispoljavaju i na način da dovode do povećane proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) koji narušavaju redoks homeostazu ćelije. Međutim, identifikacija i kvantifikacija melatonina, kao i analiza biohemijskih i morfoloških karakteristika matičnjaka i valerijane pod istovremenim uticajem teških metala i egzogenog melatonina dosada nije urađena.

U ovom radu ispitivana je uloga melatonina u prenosu signala iz životne sredine i posredovanju u odgovoru biljaka na maksimalno dozvoljene koncentracije kadmijuma i cinka. U okviru rada ispitano je djelovanje egzogenog melatonina na njegov endogeni nivo u biljnim vrstama *Melissa officinalis* i *Valeriana officinalis*. Upoređeni su i odgovori biljaka na prisustvo metala određivanjem akumulacije melatonina ili promjenom aktivnosti antioksidativnih enzima u korijenu i listovima matičnjaka i valerijane. Melatonin može, pored antioksidativne uloge, stvarati komplekse sa metalima i na taj način ispoljiti svoju zaštitnu ulogu.

2) Melatonin (*N*-acetil-5-metoksitriptamin) je indolamin izolovan 1958. godine iz goveđe epifize (Lerner i sar., 1958), a kasnije otkriven i u drugim organizmima kao što su bakterije, jednoćelijske i višećelijske alge, beskičmenjaci, kičmenjaci i više biljke (Gomez i sar., 2012; Tan i sar., 2012). Nakon identifikacije melatonina u biljkama 1995. godine, njegov sadržaj je izmjeren u korijenu, listu, plodovima, cvijetu i sjemenu raznog povrća, voća, žitarica i ljekovitog bilja (Korkmaz i sar., 2014), a kretao se između nekoliko pikograma do nekoliko mikrograma po gramu biljnog tkiva. Povećana proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS: superoksid anjon radikal (O_2^-), singletni kisik (1O_2), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksi radikal (HO)) u biljnim ćelijama je posljedica djelovanja različitih vrsta abiotičkog i biotičkog stresa (Harb i sar., 2015). I u toku normalnog metabolizma dolazi do proizvodnje ROS, ali pod uticajem različitih vrsta stresa koncentracija ROS se povećava i dolazi do nastanka oksidativnog stresa. U biljnim ćelijama ROS nastaju u hloroplastima, mitohondrijama, peroksisomima, ekstracelularnim prostorima i mogu dovesti do oksidativnih promjena proteina, lipida i DNK, što za posledicu ima promjenu njihove strukture i funkcije, a što na kraju može dovesti i do smrti ćelije.

Teški metali utiču na rast i razvoj biljaka i dovode do povećane koncentracije ROS u biljnim ćelijama i tako dovode do oksidativnog stresa (Trudić i sar., 2012). Iako brojna istraživanja ukazuju na pozitivan efekat melatonina na antioksidativni kapacitet biljaka, još uvijek nije poznat tačan mehanizam. Postoji nekoliko pretpostavki koje objašnjavaju povezanost melatonina sa

antioksidativnim kapacitetom biljaka. Melatonin može direktno da uklanja ROS (Tan i sar., 1993), povećavajući antioksidativni kapacitet biljaka (Boccalandro i sar., 2011), ili može da stimulise aktivnost enzima antioksidativne odbrane (Zhang i sar., 2014). Isto tako, melatonin poboljšava antioksidativni kapacitet biljaka povećavajući akumulaciju polifenola. Znan broj istraživanja ukazao je na značaj melatonina u regulisanju skoro svih faza rasta i razvoja biljake (od klijanja sjemena do starenja listova), kao i obrani od različitih biotičkih i abiotičkih vrsta stresa (Byeon and Back, 2014; Zhang i sar., 2015; Shi i sar., 2015, Arnao i Hernandez-Ruiz, 2015). Na akumulaciju i dostupnost toksičnih metala posebno utiču tip zemljišta, njegova pH vrijednost, kao i sadržaj organskih materija u zemljištu (Zeremski, 2005).

Literatura citirana u doktorskoj disertaciji a navedena u ovom dijelu izvještaja: Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y. (1958). Isolation of melatonin, a pineal factor that lightness melanocytes. *J. Am. Soc.*, 80, 2587. Gomez, F. J. V., Raba, J., Cerutti, S., Silva, M. F. (2012). Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle. *Journal of Pineal Research*, 52, 349–355. Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., Reiter, R. J. (2012). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *Journal of Experimental Botany*, 63, 577–597. Korkmaz, A., Deger, O., Yakup, C. (2014). Profiling the melatonin content in organs of the pepper plant during different growth stages. *Scientia Horticulturae*, 172, 242 – 247. Harb, A., Awad, D., Samarah, N. (2015). Gene expression and activity of antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) under controlled severe drought. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 109–116. Zeremski, T. (2005). *Određivanje sadržaja teških metala i njihovog oblika vezivanja u černoze mu Vojvodine metodom sekvencijalne ekstrakcije*. Magistarski rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu. Trudić, B., Kebert, M., Popović, B. M., Štajner, D., Orlović, S., Galović V. (2012). The level of oxidative stress in poplars due to heavy metal pollution in soil. *Baltic forestry*, 18, 214–227. Boccalandro, H. E., Gonzales, C. V., Wunderlin, D. A., Silva, M. F. (2011). Melatonin levels, determined by LC-ESI-MS/MS, fluctuate during the day/night cycle in *Vitis vinifera* cv Malbec: evidence of its antioxidant role in fruits. *Journal of pineal research*, 51(2), 226–232. Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., Guo, Y-D. (2015). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of Experim. Botany*, 66 (3), 647–656. Shi, H., Jiang, C., Ye, T. Tan, D.X., Reiter, R.J., Zhang, H., Liu, R., Chan, Z. (2015). Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] by exogenous melatonin. *Journal of Experimental Botany*, 66, 681–694. Byeon, Y. Back, K. (2014). An increase in melatonin in transgenic rice causes pleiotropic phenotypes, including enhanced seedling growth, delayed flowering and low grain yield. *Journal of Pineal Research*, 56, 408–414. Arnao, M. B., Hernandez-Ruiz, J. (2013). Growth conditions determine different melatonin levels in *Lupinus albus* L. *Journal of Pineal Research*, 55, 149–155.

3) U ovom radu po prvi put izvršeno je kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja melatonina u biljnim vrstama *Melissa officinalis* L i *Valeriana officinalis* L. Takođe, ispitane su i funkcije pretretmana melatoninom pri izlaganju biljaka oksidativnom stresu, tretiranjem maksimalno dozvoljenim koncentracijama kadmijuma i cinka. Pretretman melatoninom uticao je na povećanje sadržaja melatonina u odnosu na kontrolu, osim u korijenu valerijane, gdje se uočava statistički značajno smanjenje njegove koncentracije.

4) Očekivani naučni doprinos ove disertacije se odnosi na saznanja o gajenju ljekovitih biljnih vrsta na zemljištu onečišćenom toksičnim metalima, njihovom uticaju na biljnu morfologiju, te odgovor biljaka na povećani stres. Promjene u antioksidativnoj aktivnosti matičnjaka i valerijane pokazuju da melatonin u uslovima stresa izazvanog teškim metalima poboljšava tolerantnost ispitivanih biljnih vrsta na stres.

- 1) Ukratko istaći razlog zbog kojih su istraživanja preduzeta i predstaviti problem, predmet, ciljeve i hipoteze;
- 2) Na osnovu pregleda literature sažeto prikazati rezultate prethodnih istraživanja u vezi problema koji je istraživani (voditi računa da obuhvata najnovija i najznačajnija saznanja iz te oblasti kod nas i u svijetu);
- 3) Navesti doprinos teze u rješavanju izučavanog predmeta istraživanja;
- 4) Navesti očekivane naučne i pragmatične doprinose disertacije.

V MATERIJAL I METODE RADA

1) Imajući u vidu postavljene ciljeve rada primjenom odgovarajućih eksperimentalnih metoda kandidatkinja je pripremila eksperimentalnu parcelu za uzgoj odabranih biljnih vrsta matičnjaka (*Melissa officinalis* L.) i valerijane (*Valeriana oficinalis* L.). Eksperiment je izveden u poljskim uslovima po tzv. *split-plot* metodi u tri ponavljanja, tako da su odabrane biljke tretirane teškim

metalima, kadmijumom i cinkom, kao i melatoninom kao pretretmanom (6 ukupnih tretmana). Sjeme matičnjaka je posijano u posude za naklijavanje, prekriveno samo tankim slojem sitne zemlje i redovno zalijevano vodom i/ili vodenim rastvorom melatonina, koncentracije 100 μM . Sijanje sjemena izvršeno je u rano proljeće (sredinom marta), a zasađeno sjeme je bilo na temperaturi od 20 ± 1 °C. Nakon 20-25 dana od sijanja, kad su biljke dobile 4-6 para listova i dostigle visinu od 2 cm biljke matičnjaka su rasadivane na stalno mjesto u polje. Rasad valerijane dobio je u sadnicama od mjesnog sakupljača ljekovitog bilja. Jedan dio sadnica je držan u vodi, a drugi u vodenom rastvoru melatonina koncentracije 100 μM , 48 h, na tamnom, nakon čega su biljke posađene u polje na stalno mjesto. Svi uzorci nakon uzorkovanja su osušeni zamrzavanjem na temperaturi od -55 °C, 25-30 h, u liofilizatoru (VaCo 2, ZIRBUS Technology, GmbH, Germany) u laboratorijama Biotehničkog fakulteta u Bihaću. Nakon liofilizacije uzorci su čuvani na 4 °C do analize, ali ne duže od 90 dana. Sa ciljem određivanja uticaja pretretmana melatoninom i tretmana teškim metalima na morfološke karakteristike biljaka izmjerene su vrijednosti sljedećih parametara: visina biljaka, prečnik biljaka, masa svježe biljke, korijena i stabljike, masa suve biljke, korijena i stabljike i razvijenost korijena. Za mjerenje melatonina odabrana je metoda direktne ekstrakcije uz metanol kao ekstrakciono sredstvo. Analiza je vršena primjenom tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) povezane sa DAD i FLD detektorom. Sadržaj teških metala u pojedinim biljnim organima dvije biljne vrste je izmjeren pomoću Perkin Elmer 5000 atomskog apsorpcionog spektrofotometra. Koncentracija metala je određena plamenom tehnikom u režimu apsorpcije, u modu integracije.

Etanolni ekstrakti obe biljne vrste su korišteni u određivanju antioksidativne aktivnosti, ukupne sposobnosti redukcije ekstrakata FRAP metodom. Ekstrakti ukupnih fenola i flavonoida lista i korijena obe biljne vrste dobijeni su iz liofilizovanog biljnog materijala, koji je homogenizovan u 30% (V/V) etanolu u odnosu 1:10, na sobnoj temperaturi uz miješanje tokom 48 h. Ekstrakti su zatim procijeđeni na vakuumu, uz ispiranje ostatka na filtru ekstragensom, te zbog moguće degradacije termolabilnih komponenti upareni pod sniženim pritiskom na 40 °C (Rotavapor R-215, Buchi, Switzerland). Nakon 48 h sušenja u eksikatoru izmjerena je masa ostatka i izračunat prinos. Suvi ostatak je rastvoren u etanolu i razblažen do koncentracije od oko 50 mg/mL. Rastvori su čuvani na 4 °C do analize. *In vitro* testovi mjerenja antioksidativne aktivnosti određeni su pomoću PhotoLab 6600 UV-VIS spektrofotometra.

Za razdvajanje SOD izoformi korištena je nativna elektroforeza sa 10% gelom za razdvajanje. Aktivnost SOD izoformi je određena denzitometrijski pomoću programa Image Master Total Lab TL120 (Nonlinear Dynamics Ltd., Durham, USA). Svi dobijeni rezultati obrađeni pomoću softverskog paketa SPSS 24.0 statistical package (IBM, Somers, NY, USA), Origin 8.5 i predstavljeni tabelarno, grafički i kao slike gelova sa razdvojenim izoformama peroksida i superoksid dismutaza.

2) Primijenjene metode istraživanja su adekvatne, dovoljno precizne i tačne i savremene ako se uzmu u obzir dostignuća u ovom polju istraživanja na globalnom nivou. Poštovan je plan istraživanja, koji je dat prilikom prijave doktorske teze. Ispitivani parametri daju dovoljno elemenata za pouzdano istraživanje, a statistička obrada podataka je adekvatna.

1) Objasniti materijal koji je obrađivan, kriterijume koji su uzeti u obzir za izbor materijala;

2) Dati kratak uvid u primijenjeni metod istraživanja pri čemu je važno ocijeniti sljedeće:

1. Da li su primijenjene metode istraživanja adekvatne, dovoljno tačne i savremene, imajući u vidu dostignuća na tom polju u svjetskim nivoima;
2. Da li je došlo do promjene u odnosu na plan istraživanja koji je dat prilikom prijave doktorske teze, ako jeste zašto;
3. Da li ispitivani parametri daju dovoljno elemenata ili je trebalo ispitivati još neke, za pouzdano istraživanje;
4. Da li je statistička obrada podataka adekvatna.

VI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

Sadržaj melatonina u listu i korijenu matičnjaka i valerijane u okviru ovog rada razmatran je sa tri aspekta. S jedne strane, praćen je uticaj tretmana biljaka kadmijumom i cinkom (koncentracije 0,015 i 3 g/L) na sadržaj melatonina u organima valerijane i matičnjaka i njegova distribucija u listu

i korijenu, kako bi se utvrdila varijabilnost u sadržaju melatonina i razlika u biološkom odgovoru na abiotički stres izazvan djelovanjem Cd i Zn. S druge strane, proučavan je uticaj jona Zn i Cd u koncentracijama koje odgovaraju njihovim maksimalnim dozvoljenim u zemljištu za dati metal, na sadržaj melatonina. Konačno, određen je i eventualni uticaj povećanja sadržaja melatonina sa i bez prisustva teških metala na sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, sposobnost neutralisanja slobodnih radikala, antioksidativnu aktivnost ekstrakta biljaka, sadržaj solubilnih proteina, aktivnost nekih antioksidativnih enzima, te heliranja metala.

Identifikacija i kvantifikacija melatonina po prvi puta je izvršena u biljkama *Melissa officinalis* L. i *Valerijana officinalis* L. primjenom tečne hromatografije visokih performansi povezane sa fluorescentnim i UV-Vis detektorom. Obe biljne vrste nisu pokazale povećanje sadržaja endogenog melatonina u biljkama tretiranih egzogenim melatoninom. Matičnjak je imao pozitivan trend rasta sadržaja endogenog melatonina i to za 40% povećanja u korijenu, te 25% povećanja u listu u odnosu na kontrolu. Egzogeno dodat melatonin dovodi do smanjenja koncentracije endogenog melatonina u korijenu (za 40%) i listu (za 5%).

Dobijeni rezultati su pokazali da su veće koncentracije Zn usvojene od strane lista. Koncentracija Zn u korijenu se povećava prema redosljedu: kontrola < tretman sa Cd < tretman sa Zn, za obe biljne vrste. Najznačajnije povećanje koncentracije Zn u odnosu na kontrolu je izmjereno u korijenu matičnjaka i valerijane pretretiranih egzogenim melatoninom i tretiranih sa Zn. Akumulacija kadmijuma u listu i korijenu pokazuje značajnu zavisnost od biljne vrste, gdje se kod valerijane uočava znatno veća sposobnost akumulacije Cd i u korijenu i listu u poređenju sa matičnjakom.

Osim identifikacije i kvantifikacije melatonina, te distribucije metala u analiziranim biljnim organima rezultati su pokazali prisustvo značajno veće koncentracije Mg i Ca u listu obe ljekovite vrste u odnosu na korijen.

Rezultati pokazuju statistički značajno povećanje sadržaja magnezijuma u korijenu matičnjaka tretiranog sa Cd (0,15 mg/g) i blago povećanje kod korijena biljaka tretiranih sa Zn (0,11 mg/g) u odnosu na sadržaj u kontroli (0,10 mg/g). Egzogeno primjena melatonina dovela je do povećanja sadržaja ukupnih fenola u odnosu na kontrolu kod matičnjaka (2 puta veći sadržaj, 68,9 mg/g). Melatoninom pretretirane biljke tretirane sa Cd i Zn pokazuju statistički značajno veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na kontrolne biljke, međutim njihov sadržaj je značajno manji u odnosu na biljke tretirane teškim metalima bez pretretmana sa melatoninom. Ispitivanje uticaja teških metala i egzogenog melatonina na sadržaj solubilnih proteina pokazalo je da svi tretmani i pretretman melatoninom utiču na značajno povećanje sadržaja proteina u korijenu i listu matičnjaka i valerijane. Dobiveni rezultati su pokazali da se aktivnost peroksidaza nakon tretmana sa Cd smanjuje u korijenu i listu obje ispitivane biljne vrste. U listovima matičnjaka su nativnom elektroforezom detektovane tri SOD izoforme, označene kao mSOD1 ($R_f=0,117$), mSOD2 ($R_f=0,834$) i mSOD3 ($R_f=0,886$). U listovima valerijane razdvojene su dvije SOD izoforme, označene kao vSOD1 ($R_f=0,640$) i vSOD2 ($R_f=0,856$). Izoforma vSOD2 detektovana je u svim fazama razvoja kontrolnih i svih tretiranih listova valerijane. Sa druge strane, vSOD1 izoforma detektovana je u svim fazama razvoja samo u kontrolnim listovima valerijane, a njena indukcija i inhibicija zavisi od tretmana i faze razvoja biljke. Antioksidativni testovi pokazali su da egzogeni melatonin utiče na statistički značajno povećanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala i na sposobnost redukcije Fe jona /FRAP test/ ekstrakta korijena i lista matičnjaka i valerijane. List matičnjaka pokazuje značajno veću sposobnost redukcije Cu i Fe jona, te neutralizacije DPPH radikala u odnosu na njegov korijen.

Maksimalna sposobnost biljnih ekstrakata da heliraju željezo uočava se u korijenu i listu biljaka tretiranih teškim metalima, u kombinaciji sa egzogenim melatoninom, što ukazuje na moguće djelovanje egzogenog melatonina u zaštiti od oksidativnog stresa.

Dobijeni rezultati su jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni i poređeni sa rezultatima drugih autora.

- 1) Ukratko navesti rezultate do kojih je kandidat došao;
- 2) Ocijeniti da li su dobijeni rezultati jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni, upoređujući sa rezultatima drugih autora i da li je kandidat pri tome ispoljavao dovoljno kritičnosti;
- 3) Posebno je važno istaći do kojih novih saznanja se došlo u istraživanju, koji je njihov teorijski i praktični doprinos, kao i koji novi istraživački zadaci se na osnovu njih mogu utvrditi ili nazirati.

VII ZAKLJUČAK I PRIJEDLOG

1) Doktorska disertacija mr Elvise Hodžić pod nazivom „Kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L.” urađena je prema pravilima naučnoistraživačkog rada i rezultat je originalnog naučnog rada kandidata. Pored toga, kandidatkinja je precizno i logički analizirala predloženu temu istraživanja i podatke dovela u vezu sa postavljenom hipotezom. Dobijeni rezultati jasno su ukazali da melatonin, kao vrlo aktivna molekula ima ogroman potencijal za istraživanje osnovnih životnih funkcija i nudi mogućnosti za poboljšanje raznolikosti procesa u kultivaciji biljaka i industrijskoj poljoprivredi.

Naučna vrijednost ove doktorske disertacije ogleda se i u naučnom radu proizašlom iz dijela aktivnosti na njenoj izradi, a publikovanom u naučnom časopisu koji je indeksiran u renomiranim citatnim bazama (SCI/SCIE) za navedenu naučnu oblast, sa impakt faktorom.

2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije Komisija predlaže Nastavno-naučnom vijeću da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom “Kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L”, prihvati, i da kandidatkinji mr Elvisi Hodžić odobri odbranu.

1) Navesti najznačajnije činjenice što tezi daje naučnu vrijednost, ako iste postoje dati pozitivnu vrijednost samoj tezi;

2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije komisija predlaže:

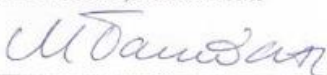
- da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana,
- da se doktorska disertacija vraća kandidatu na doradu (da se dopuni ili izmijeni) ili
- da se doktorska disertacija odbija.

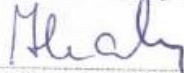
POTPIS ČLANOVA KOMISIJE

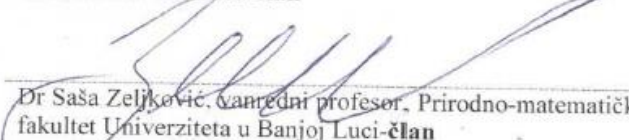
Datum: april 2019. godine

1. 
Dr Biljana Kukavica, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, **predsjednik**

2. 
Dr Semira Galijašević, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu i vanredni profesor, Sarajevo School of Science and Technology, Medical School, mentor-**član**

3. 
Dr Milica Balaban, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, mentor-**član**

4. 
Dr Halid Makić, vanredni profesor, Biotehnički fakultet Univerziteta u Bijaču-**član**

5. 
Dr Saša Zeljković, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci-**član**

IZDVOJENO MIŠLJENJE: Član komisije koji ne želi da potpiše izvještaj jer se ne slaže sa mišljenjem većine članova komisije, dužan je da unese u izvještaj obrazloženje, odnosno razlog zbog kojih ne želi da potpiše izvještaj.

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

**Izjavljujem
da je doktorska disertacija**

Naslov rada Kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L.

Naslov rada na engleskom jeziku Qualitative and quantitative determination of melatonin and its possible functions in the presence of heavy metals in *Melissa officinalis* L. and *Valeriana officinalis* L. plant organs

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cjelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci 06.05.2019.

Potpis doktoranta

Elusa Hodžić

Izjava 2

**Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci
da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom**

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom Kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L.

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Banjoj Luci 06.05.2019.

Potpis doktoranta



Izjava 3

Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora	Elvisa Hodžić
Naslov rada	Kvalitativno i kvantitativno određivanje melatonina i mogućih funkcija u prisustvu teških metala u biljnim organima <i>Melissa officinalis</i> L. i <i>Valeriana officinalis</i> L.
Mentori	dr. Semira Galijašević, vanredni profesor, Sarajevo School of Science and Technology i dr. Milica Balaban, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banja Luci, Bosna i Hercegovina

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predao/la za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci 06.05.2019.

Potpis doktoranta

