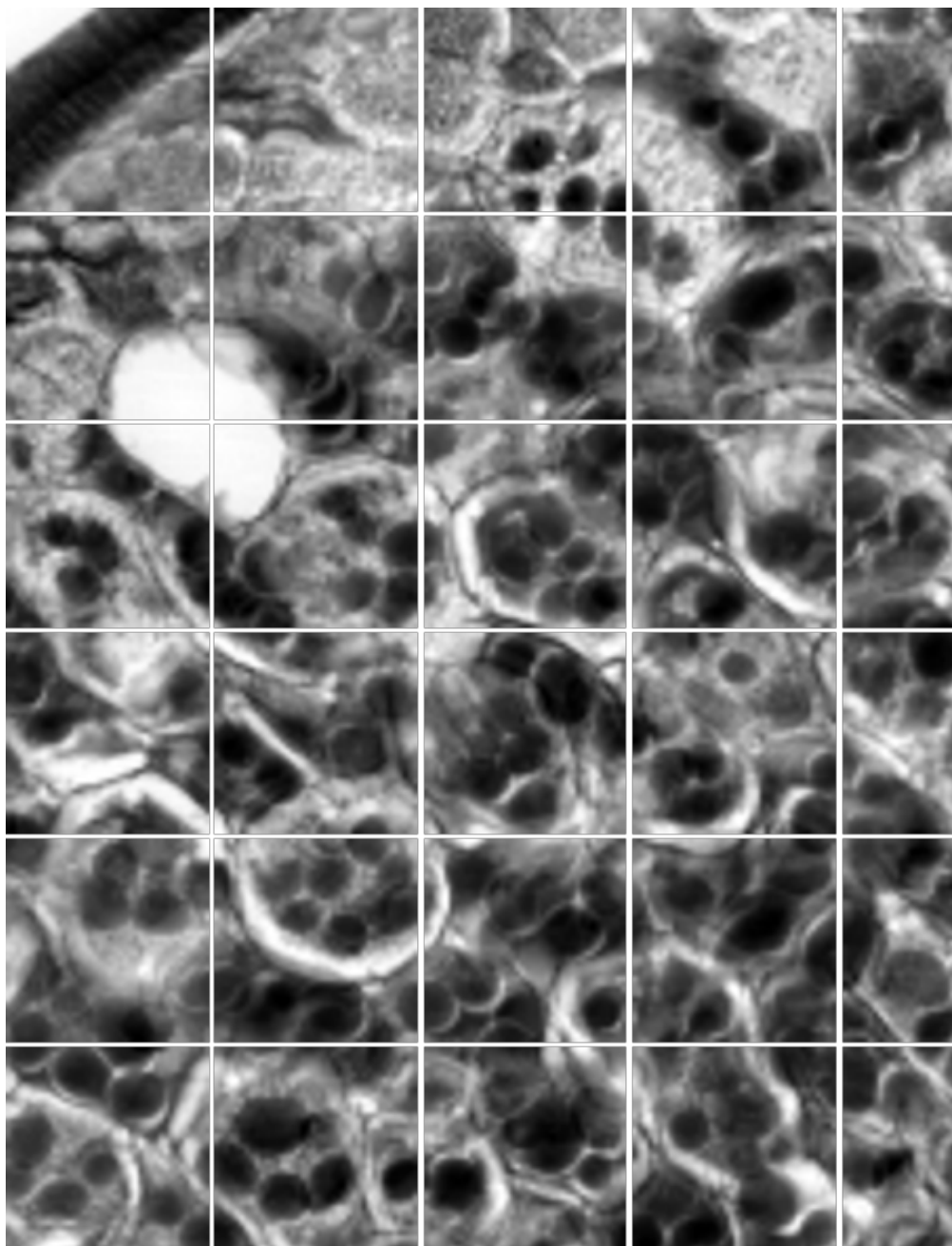


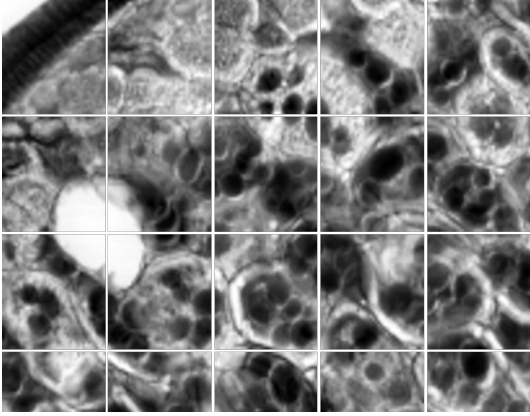
2020 Vol. 11

C S P P

COLLECTANEA STUDENTIIUM PHYSIOLOGIAE PLANTARUM



ZGODBA IZ NASLOVNICE



Slika prečnega prereza fižola z rentgenskimi žarki.

Slika: Paula Pongrac, Katarina Vogel-Mikuš

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum
Zbornik študentov fiziologije rastlin

Izdajata: Katedra za fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, UL

Glavna in odgovorna urednica: Marjana Regvar, marjana.regvar@bf.uni-lj.si

Tehnični urednik: Matevž Likar

Uredniški odbor:

Marjana Regvar

Matevž Likar

Katarina Vogel-Mikuš

Naslov uredništva:

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum,

Zbornik študentov fiziologije rastlin

Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

Izdano: 2020

ISSN 1854-4193 (online: <http://www.bf.uni-lj.si/oddelek-za-biologijo/oddelek/katedre/botanika-in-fiziologija-rastlin/>)

4 VPLIV NIZKOTEMPERATURNE PLAZME NA PRIVZEM VODE, VIABILNOST IN KALIVOST AJDE (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*)

Marija Gjorgoska, Nada Gvozdenovič, Nika Šijanec, Hana Trček, Zala Vidic

9 VPLIV BAKTERIJE *KLEBSIELLA OXYTOCA* NA PRIVZEM CINKA IN SVINCA PRI SONČNICI (*HELIANTHUS ANNUUS*)

Jan Dolenc, Martina Mravinec, Matic Pinter, Klavdija Plesnik, Janja Skok, Dejan Slokar

14 VPLIV HLADNE KISIKOVE PLAZME NA GLIVNO SESTAVO SEMEN JEČMENA (*HORDEUM VULGARE*)

Urša Miklavčič, Rebeka Podgrajšek, Karmen Treven, Jure Zaman, Špela Zupančič

19 VPLIV NIZKOTEMPERATURNE PLAZME NA POJAVLJANJE GLIV NA SEMENIH PARADIŽNIKA (*SOLANUM LYCOPERSICUM*)

Pia Golob, Matej Milijaš Jotič, Matevž Jus, Jernej Počič, Melisa Topčagič

23 VPLIV NIZKOTEMPERATURNE PLAZME NA PRIVZEM VODE, VIABILNOST IN KALJIVOST PARADIŽNIKA

Petra Drčar, Sara Eržen, Nika Pirnat, Julija Ržišnik in Ajda Vrabič

28 VPLIV SODE BIKARBONE NA RAST FIŽOLA

Lara Beden, Angela Doneva, Živa Kolenc, Eva

Lavrenčič, Tamara Petrushevikj

33 VPLIV NIZKOTEMPERATURNE PLAZME NA KALJIVOST IN ZDRUŽBO GLIV SEMEN TATARSKE AJDE (*FAGOPYRUM TATARICUM*)

Alen Fuks, Marija Jovcevska, Vanja Kolar, Matjaž Kordiš, Kristina Matijašič

38 VPLIV NIZKOTEMPERATURNE PLAZME NA ZDRUŽBO GLIV SEMEN AJDE

Fišer Sara, Klobučar Nika, Pavšič Ana, Vodnik Luka, Vršnik Julijan

Vpliv nizektemperaturne plazme na privzem vode, viabilnost in kalivost ajde (*Fagopyrum esculentum*)

Marija Gjorgoska, Nada Gvozdrenović, Nika Šijanec, Hana Trček, Zala Vidic

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Nizektemperaturna plazma ima širok potencial za uporabo v živilski tehnologiji in nekonvencionalnem kmetijstvu, saj naj bi vzpodbujala kalitev in zgodnjo rast sadik, povečala pridelok ter mikrobnno inaktivirala površino semen. Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*) vsebuje veliko kvalitetnih proteinov in esencialnih aminokislin, ki jih sicer mnogim žitom primanjkuje, zato smo želeli preveriti, kako nizektemperaturna plazma vpliva na privzem vode, viabilnost in kalivost semen ajde.
- Semena smo obdelali z nizektemperaturno kisikovo plazmo, z uporabo radiofrekvenčnega reaktorja Induktio, pri tlaku 50 Pa, delovni moči 1300 W ter različnih časih izpostavitve: 30 s, 60 s, 90 s, 120 s. Privzem vode smo določili preko spremljanja mase semen v prvih osmih urah in po 24. urah, viabilnost smo določili s tetrazolijevim testom, kalivost pa smo spremljali v kalilnikih ter več dni opazovali rast korenin in število sekundarnih korenin.
- Pri semenih ajde izpostavljenih nizektemperaturni plazmi je privzem vode višji v primerjavi s kontrolnimi semeni. Opazili smo pozitivno korelacijo med časom trajanja izpostavitve plazmi in privzemom vode, kar je verjetno posledica izpostavljenosti kisikovim radikalom v nizektemperaturni plazmi. Na podlagi prebrane literature sklepamo, da sprožijo kisikovi radikali erozijo semenske ovojnice in s tem povečajo hidrofilnost. Povečanje trajanja nizektemperaturni z uporabo radiofrekvenčnega reaktorja Induktio izpostavitve plazmi negativno vpliva na viabilnost, kalivost, dolžino primarnih korenin in število sekundarnih korenin.

Ključne besede: navadna ajda, nizektemperaturna plazma, kalivost semen, viabilnost semen, privzem vode

Uvod

Zaradi dobre kvalitete proteinov in visoke vsebnosti esencialnih aminokislin, kot je lizin, ki ga mnogim žitom primanjkuje, je v zadnjem času popularnost ajde (*Fagopyrum esculentum*) izjemno narastla. Vsebnost semen (63 % ogljikovih hidratov, 11.7 % proteinov, 2.4 % maščob, 9.9 % vlaknin, 11 % vode in 2 % mineralov) ima visoko hranilno vrednost (Ratan in Kothiyal, 2011). Ajda je zaradi nizke vsebnosti prolamina, sestavine glutena, primerna za bolnike s celiakijo in ima zaradi ustreznega aminokislinskega razmerja pozitiven vpliv na nižanje holesterola. K temu pripomore tudi nizka prebavljivost vlakninam podobnih sestavin ajde ter vsebnost fitosterolov. Flavonoidi v ajdi, med katerimi prevladuje rutin, delujejo antioksidativno, proteini, sposobni vezave vitamina B1 (tiamina), pa izboljšajo stabilnost in biološko razpoložljivost le-tega (Krkoškova in Mrazova, 2005). Poleg naštetega je ajda tudi pomembna medonosna in farmacevtska rastlina (Ratan in Kothiyal, 2011). Spodbujanje kalitve semen z uporabo plazme ali drugih fizičnih in kemičnih metod je eden glavnih načinov za povečanje pridelka (Ling s sod. 2014), zato ima obdelava z nizkotemperaturno plazmo širok spekter uporabe v živilski tehnologiji in nekonvencionalnem kmetijstvu. Poleg aktivacije kalitve semen se omenjen postopek uporablja tudi za mikrobno inaktivacijo površine semen ali sadežev, spodbujeno zgodnjo rast sadik ter povečanje kvalitete biološko aktivnih delov kalečih semen (Šeras sod. 2018).

Z raziskavo smo želeli ugotoviti vpliv nizkotemperaturne plazme na privzem vode, viabilnost in kalivost semen ajde. Predvidevali smo, da bodo učinki plazme na semenih ajde spremenili prepustnost za vodo, saj ioniziran plin povzroči tvorbo prostih radikalov na površini in s tem kemijske in fizikalne spremembe na površini semen. Pričakovali smo tudi, da bodo zaradi večjega privzema vode, semena obdelana s plazmo hitreje vzkalila in bo pri njih rast intenzivnejša, v primerjavi z neobdelanimi semeni.

Material in metode Material

Semena navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*), na katerih smo merili privzem vode, viabilnost in kalivost, so bila predhodno obdelana z nizkotemperaturno kisikovo (O₂) plazmo z uporabo radiofrekvenčnega reaktorja Induktio (ICP, inductively coupled plasma) na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Vzorci so bili nanešeni na mrežast aluminijast pladenj znotraj cevi s plazmo, kjer so bili izpostavljeni stalnim dejavnikom (tlak 50 Pa, delovna moč 1300 W), med vzorci pa se je razlikoval čas izpostavljenosti plazmi (30 s, 60 s, 90 s, 120 s ter 0 s za kontrolno meritev).

Priprava in analiza vzorcev za merjenje privzema vode

Privzem vode semen smo merili preko spremembe mase dvajsetih semen v petrijevki z destilirano vodo pri sobni temperaturi skozi čas. Pri vsaki obdelavi s plazmo smo naredili 5 vzporednih meritev po 20 semen. Maso semen smo prvih osem ur merili v enournih intervalih ter maso izmerili še po 24. urah. Za izračun privzema vode smo uporabili naslednjo formulo: $WU = 100 \times (FW - DW) / DW$.

WU = privzem vode, FW = masa semen po shranjevanju v destilirani vodi, DW = masa suhih semen (Zahoranová s sod. 2018).

Priprava in analiza vzorcev za merjenje viabilnosti

Za test smo uporabili po 50 semen za posamezno časovno obdelavo s plazmo ter kontrolo. Semena, ki so bila za lažje rezanje namočena, smo s skalpelom prerezali na pol in polovico vsakega semena položili v petrijevke ter jih čez noč izpostavili tetrazolijevemu kloridu. Naslednji dan smo prešteli rdeče obarvane viabilne kalčke semen.

Priprava in analiza vzorcev za merjenje kalivosti

Za test kalivosti smo izvedli pet vzporednih meritev na desetih semenih ajde iz vsakega tretmaja s plazmo. Semena smo postavili v prozorne plastične kalilnike, kjer je spodnji del kalilnika prekrival črn papir, da smo lahko poleg štetja vzkaljenih semen in sekundarnih korenin iz slik in programa ImageJ izmerili dolžino zraslih. Za izračun mere kalivosti smo uporabili odstotek kalečih semen (Măgureanu s sod. 2018):

Statistična analiza

Za izračun parametrov in analizo dobljenih rezultatov s standardnimi statističnimi metodami smo uporabili program Excel 2018 (Microsoft) z dodatkom Daniel's XL Toolbox oz. s programom SigmaPlot. Razlike med tretmaji smo ovrednotili z analizo variance (ANOVA) in Holm-Šidák post-hoc testom oz. on Ranks, Tukey post-hoc testom pri $p < 0,05$.

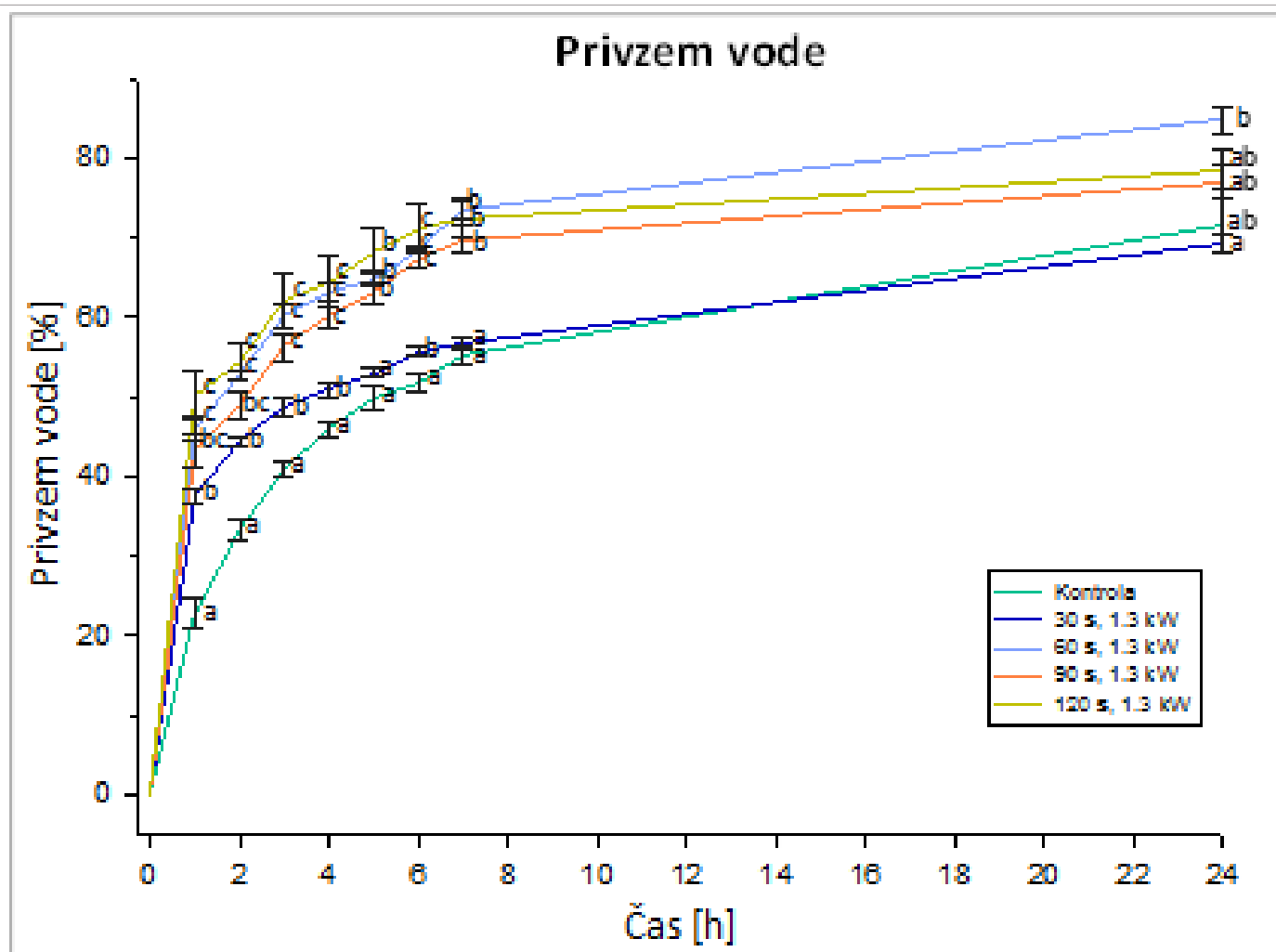
Rezultati

Učinki nizkotemperaturne plazme na privzem vode

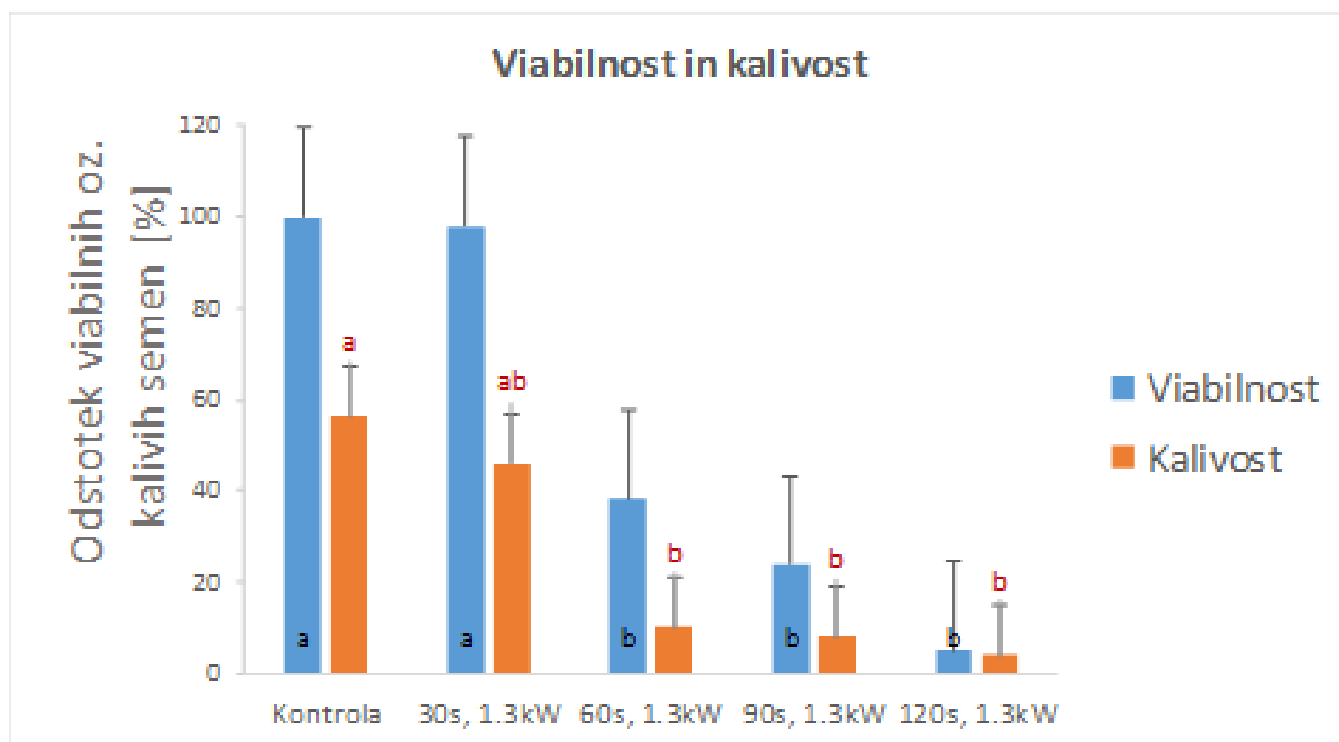
Učinki na privzem vode so pri semenih ajde, obdelanih z nizkotemperaturno plazmo, odvisni od časa trajanja izpostavitve plazmi (slika 1). Opazili smo, da je pri semenih, ki so bila dalj časa izpostavljena plazmi, privzem vode statistično značilno višji v primerjavi s kontrolnimi semeni. To je še posebej razvidno v prvih šestih urah trajanja poskusa. Največje razlike v privzemu vode so bile opažene v prvi uri po dodajanju vode (1.3 kW, 30 s 64%; 60 s 101.3%; 90 s 89.2%; 120 s 119.5% večji privzem vode v primerjavi s kontrolo). Razlike v privzemu vode med različnimi obdelavami semen se tekom 24. ur trajanja poskusa niso spreminjale, le razlike posameznega tretmaja v primerjavi s kontrolo so bile manjše (po 24. urah: 1.3 kW, 60 s 18.7%; 90 s 7.7%; 120 s 10% večji privzem vode v primerjavi s kontrolo).

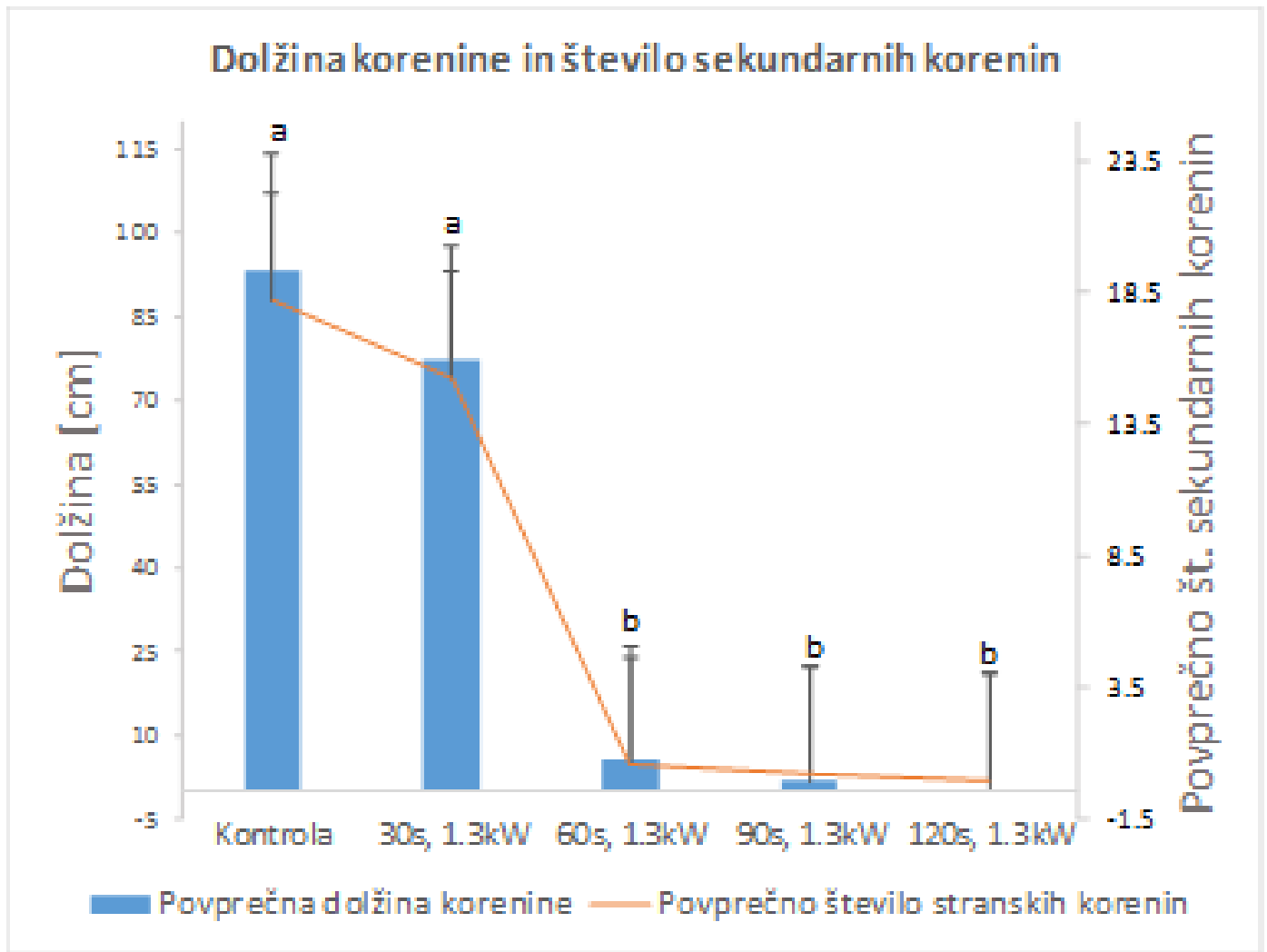
Učinki nizkotemperaturne plazme na viabilnost in kalivost semen

Učinki na viabilnost in kalivost semen ajde, obdelanih z nizkotemperaturno plazmo, so odvisni od časa trajanja izpostavitve plazmi (slika 2). Opazili smo, da obdelava semen z nizkotemperaturno plazmo pri 1.3 kW za 30 s nima statistično značilnih vplivov na viabilnost semen (kontrola 100 %; 1.3 kW, 30 s 97.92 %) in na kalivost semen (kontrola 56.25 %; 1.3 kW, 30 s 46 %) v primerjavi s kontrolo. Pri daljših časih izpostavitve semen plazmi: 60 s, 90 s, 120 s pri 1.3 kW pa je opazno statistično značilno znižanje viabilnosti semen (38.3 %; 23.8 %; 5 %, pri posameznih tretmajih) in kalivosti semen (10 %; 8



Slika 1: Privzem vode pri semenih ajde (*Fagopyrum esculentum*). Na grafu so prikazane povprečne vrednosti podatkov \pm SE za pet ponovitev na skupino ter 20 semen na ponovitev. Z različnimi črkami (a, b, c) so prikazane statistično značilne razlike, določene z One Way ANOVA, Holm-Sidak post-hoc testom.





Slika 3: Dolžina primarnih korenin in število sekundarnih korenin ajde (*Fagopyrum esculentum*). Na grafu so prikazane povprečne vrednosti podatkov \pm SE za pet ponovitev na skupino, deset semen na ponovitev, na šesti dan po kalitvi semen. Z različnima črkama (a, b) so prikazane statistično značilne razlike, ki so za dolžino in povprečno število sekundarnih razlik enake, določene so z One Way ANOVA on Ranks, Tukey post-hoc testom.

Slika 2 (levo): Viabilnost in kalivost semen ajde (*Fagopyrum esculentum*). Na grafu so prikazane povprečne vrednosti podatkov \pm SE za dve ponovitvi na skupino (viabilnost) in pet ponovitev na skupino (kalivost) ter 10 semen na ponovitev. Z različnima črkama (a, b) so prikazane statistično značilne razlike, določene z One Way ANOVA, Holm-Sidak post-hoc testom.

%; 4 %, pri posameznih tretmajih).

Učinki nizektemperaturne plazme na koreninski sistem ajde

Učinki na rast primarnih in sekundarnih korenin ajde, so odvisni od časa trajanja izpostavitve semen nizkotemperaturni plazmi (slika 3). Opazili smo, da semena izpostavljena plazmi pri 1.3 kW za 30 s nimajo statistično značilnih vplivov na dolžino primarnih korenin (kontrola 93.4 mm; 1.3 kW, 30 s 77.4 mm) in število sekundarnih korenin, v primerjavi s kontrolo (kontrola 18.18; 1.3 kW, 30 s 15.2). Po drugi strani opazimo pri daljšem času izpostavitve semen plazmi: 60 s, 90 s, 120 s pri 1.3 kW, statistično značilno znižanje dolžine primarnih korenin (5.7 mm, 1.9 mm, 0.5 mm, pri posameznih tretmajih) in števila sekundarnih korenin (0.6, 0.2, 0, pri posameznih tretmajih).

Diskusija

V skladu s podatki Zaharove s sod. (2016), ki opisujejo pozitivno korelacijo med trajanjem izpostavitve plazmi in privzemom vode semena pšenice v prvih nekaj urah poskusa, smo tudi v našem poskusu opazili največje razlike v prvi uri po izpostavitvi semen vodi. Do enakih zaključkov so prišli Ling s sod. (2014) pri tretiranju semen soje ter Barmashenko s sod. (2012) pri tretiranju semen ovsu in pšenice. Tudi raziskave na drugih vrstah so večinoma pokazale pozitiven efekt nizkotemperaturne plazme na privzem vode. Po podatkih iz literature (Ling s sod. 2014) je pozitiven učinek nizkotemperaturne plazme na privzem vode posledica izpostavljenosti kisikovim radikalom v nizkotemperaturni plazmi. Ioni napadajo površino semen, kar povzroča erozijo semenske ovojnice. Erodirani površini se poveča hidrofilnost in izboljša privzem vode.

V nadaljnjih raziskavah vplivov nizekotemperaturne plazme na privzem vode, bi bilo potrebno preveriti, ali pri višjih časih izpostavitve plazmi temperatura v radiofrekvenčnem reaktorju naraste. Predvidevamo, da je večji privzem vode pri daljših časih izpostavitve plazmi posledica morebitne povišane temperature, kar bi privedlo do večjega izhlapevanja vode iz semen.

Viabilnost in kalivost semen ajde, izpostavljenih nizekotemperaturni plazmi, sta odvisni od tipa naprave, ki ustvarja plazmo, in trajanja izpostavitve oz. kombinacije teh dveh faktorjev (Šera s sod. 2012). Tudi na podlagi naših rezultatov lahko trdimo, da sta viabilnost in kalivost semena ajde odvisna od časa izpostavitve nizekotemperaturni plazmi. Pri trajanju izpostavitve 30 s ni bilo dokazanih statistično značilnih razlik v viabilnosti in kalivosti semen, medtem ko je pri izpostavitvi za 60 s, 90 s in 120 s izmerjen negativen vpliv nizekotemperaturne plazme. Pri izpostavitvi za 120 s se je viabilnost semen znižala za 95 % in kalivost semen za 93 %. Iz našega poskusa ne moremo trditi, da sta viabilnost in kalivost semen ajde odvisna od tipa naprave, vendar je iz literature (Šera s sod. 2012) razvidno, da je pri enako dolgi izpostavitvi semen ajde pri nekaterih tipih naprav prišlo do pozitivnih, pri drugih pa do negativnih učinkov. Zaharova s sod. (2016) so ugotovili, da daljša izpostavitvev semen koruze nizekotemperaturni plazmi inhibira viabilnost in kalivost semen, Magureanu s sod. (2018) pa so pokazali, da izpostavljenost semen paradižnika nizekotemperaturni plazmi za 300 s poveča kalivost semena iz 68 % na 77 %.

Šera s sod. (2018) trdijo, da se vpliv nizekotemperaturne plazme na viabilnost in kalivost semen razlikuje med različnimi vrstami rastlin in pri različni časovni izpostavitvi. Raziskave so delali na semenih maka (Šera s sod. 2013), semenih bele metlike (Šera s sod. 2008), pšenici (Šera s sod. 2010) in konoplji (Šera s sod. 2017). Pri semenih maka in pšenice so izmerili izboljšano kalivost pri nekaj minutni izpostavitvi plazmi, medtem ko je pri daljši izpostavitvi kalivost semen upadla. Pri beli metliki je prišlo do povečane kalivosti pri izpostavitvi med 30 in 48 min. Kalitev semena konoplje obdelane z nizekotemperaturno plazmo je bila, ne glede na čas trajanja izpostavitve semen, inhibirana.

Sorazmerno vplivu nizekotemperaturne plazme na viabilnost in kalivost je opazen negativen vpliv plazme tako na dolžino primarnih korenin kot tudi na število sekundarnih korenin. Tudi tukaj so učinki nizekotemperaturne plazme odvisni od trajanja izpostavitve semen – pri izpostavljenosti za 120 s se dolžina primarnih korenin v povprečju zmanjša za 99,5 %, sekundarne korenine pa ne izrastejo. V raziskavah, kjer so izmerili pozitiven vpliv nizekotemperaturne plazme na viabilnost in kalivost, so bili tudi učinki na dolžino primarnih korenin in število sekundarnih korenin pozitivni, kot je primer v podatkih Magureanus s sod. (2018).

Zaključki

Pri ajdi nizekotemperaturna plazma z uporabo radiofrekvenčnega reaktorja Induktio pri 1,3 kW pozitivno vpliva na privzem vode, kjer je opazna pozitivna korelacija med trajanjem izpostavitve plazmi in privzemom vode. Rezultati raziskave so v skladu z našo predhodno postavljeno hipotezo. Hipotezo, kjer smo predpostavili, da bodo semena obdelana s plazmo zaradi večjega privzema vode hitreje vzkalila in rastla intenzivneje, v primerjavi z neobdelanimi semeni, smo

ovrgli. Naši rezultati so pokazali, da je tako vpliv na viabilnost in kalivost, kot tudi na dolžino primarnih korenin in število sekundarnih korenin odvisen od trajanja izpostavitve semen, kjer se s povečanjem trajanja izpostavitve plazmi omenjeni parametri zmanjšujejo.

Literatura

- Bormashenko E, Grynyov R, Bormashenko Y, Drori E, 2012. Cold radiofrequency plasma treatment modifies wettability and germination speed of plant seeds. *Sci Rep* 2(1):741
- Krkoškova B., Mrazova Z. 2005. Prophylactic components of buckwheat. *Food Research International*.38 (5) 561-568 Ling L, Jiafeng J, Jiangang L, Minchong S, Xin H, Hanliang S, Yuanhua D, 2014. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Scientific reports* 4:5859
- Măgureanu M, Sîrbu R, Dobrin D, Gîdea M, 2018. Stimulation of the germination and early growth of tomato seeds by non-thermal plasma. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 38 (5):989-1001
- Ratan P, Kothiyal P, 2011. *Fagopyrum esculentum* Moench (common buckwheat) edible plant of Himalayas: a review.
- Asian Journal of Pharmacy and Life Science* ISSN 2231:4423
- Šera B, Šery M, 2018. Non-thermal plasma treatment as a new biotechnology in relation to seeds, dry fruits, and grains. *Plasma Science and Technology* 20 (4):044012
- Šera B, Sery M, Gavril B, Gajdova I, 2017. Seed germination and early growth responses to seed pre-treatment by non-thermal plasma in hemp cultivars (*Cannabis sativa* L.). *Plasma Chem Plasma Process* 37(1):207–221
- Šerá B, Gajdová I, Šerý M, Špatenka P, 2013. New physicochemical treatment method of poppy seeds for agriculture and food industries. *Plasma Sci Technol* 15(9):935
- Šera B, Gajdová I, Černák M, Gavril B, Hnatiuc E, Kováčik D, Kříha V, Sláma J, Šerý M, Špatenka P, 2012. How various plasma sources may affect seed germination and growth. *IEEE Trans Plasma Sci* 978-1-4673-1653- 8/12
- Šera B, Špatenka P, Sery M, Vrchotova N, Hruskova I, 2010. Influence of plasma treatment on wheat and oat germination and early growth. *IEEE Trans Plasma Sci* 38(10):2963–2968
- Zahoranová A, Hoppanová L, Šimončicová J, Tučeková Z, Medvecká V, Hudecová D, Kaliňáková B, Kováčik D, Černák M, 2018. Effect of cold atmospheric pressure plasma on maize seeds: enhancement of seedlings growth and surface microorganisms inactivation. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 38 (5):969-988
- Zahoranová A, Henselová M, Hudecová D, Kalinakova B, Kováčik D, Medvecká V, Černak M, 2016. Effect of cold atmospheric pressure plasma on the wheat seedlings vigor and on the inactivation of microorganisms on the seeds surface. *Plasma Chem Plasma Process* 36:397–414.

Vpliv bakterije *Klebsiella oxytoca* na privzem cinka in svinca pri sončnici (*Helianthus annuus*)

Jan Dolenc, Martina Mravinec, Matic Pinter, Klavdija Plesnik, Janja Skok, Dejan Slokar

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Ugotoviti vpliv bakterije *Klebsiella oxytoca* na privzem težkih kovin, predvsem cinka in svinca, pri sončnici (*Helianthus annuus*).
- Kalitev sončnice in spremljanje rasti korenin ter poganjkov v treh serijah (kontrola (K), živa bakterija (ŽB), avtoklavirana bakterija (AB)), primerjava sveže in suhe mase poganjkov in korenin, analiza koncentracije kovin v koreninah in poganjkih, merjenje vsebnosti fotosinteznih pigmentov poganjkov, merjenje transpiracije, merjenje učinkovitosti fotosistema II. Statistična obdelava v R studiu, z enosmerno analizo variance (ANOVA), post-hoc s Tukeyevim testom ter obdelava podatkov iz rentgenske fluorescenčne spektroskopije s programom Microsoft Office Excel z dodatkom XL Toolbox z metodo Dunnettovega testa.
- Vidne so nekroze listov pri vseh testiranih serijah, pri seriji z dodatkom živih bakterij opazimo povišane koncentracije izmerjenih elementov (osredotočili smo se na koncentracijo cinka in svinca), v seriji ŽB sta opazni zmanjšana transpiracija in dejanska fotosintezna učinkovitost fotosistema II. Statističnih razlik pri vsebnosti fotosinteznih barvil nismo opazili.
- Prisotnost bakterije *Klebsiella oxytoca* poveča privzem snovi v rastlino, kar je v našem primeru predvsem negativno vplivalo na nekatere merljive fiziološke parametre. Za zanesljivejše zaključke bi morali izvesti več ponovitev.

Ključne besede: *Klebsiella oxytoca*, svinec, cink, akumulacija, fitoremediacija

Uvod

Ena izmed večjih posledic antropogenega pritiska na okolje je kopičenje težkih kovin, kot sta svinec (Pb) in cink (Zn) v različnih plasteh prsti in v vodi. Kontaminacija s težkimi kovinami predstavlja veliko nevarnost za ekosisteme, kmetijstvo in zdravje ljudi in živali (Kong in Glick, 2017).

Za odstranjevanje težkih kovin iz okolja lahko uporabimo pristop imenovan fitoremediacija, ki za namene razstrupljanja uporablja rastline in z njimi povezane mikrobe (Kong in Glick, 2017). Učinkovitost fitoakumulacije je odvisna od sposobnosti rastline, da privzame visoke koncentracije kovin in da proizvede čim več biomase. Na žalost pa lahko, čeprav je veliko kovinskih elementov esencialnih za rastline, povečan privzem negativno vpliva na rast in razvoj rastlin (Burd in sod., 2000). Vzrok za strupenost kovinskih elementov v sledih pri visokih koncentracijah je oksidativni stres, ki je posledica tvorbe prostih radikalov in motenje pigmentnih ter encimskih funkcij (Ghosh in Singh, 2005). Splošni simptomi, ki jih povzročijo strupenost cinka so manjši, nekrotični listi, takšni so predvsem mlajši listi. Glavna korenina je manjša kot običajno, manj je tudi stranskih korenin, vse korenine pa so na splošno bolj rumenkaste barve (Reichman, 2002). Prevelika koncentracija svinca v rastlinah pa se opazi kot zmanjšanje rasti, ovenelost starejših listov, kratke, rjave korenine in temno zeleni listi (Sharma in Dubey, 2005).

Ena izmed možnosti, da zmanjšamo strupenost kovin za rastline, je inokulacija korenin z bakterijami, ki promovirajo rast rastlin (Li, 2007). V prsti lahko najdemo veliko število različnih mikroorganizmov, ki skupaj s koreninskim delom rastline tvorijo rizosfero. V takšnih specifičnih združbah rastlina preskrbuje bakterijo z virom ogljika in drugimi hranili, v zameno pa bakterije spodbujajo rast rastlin (Burd in sod., 2000). Rizobakterije, ki promovirajo rast rastlin, so lahko prostoživeče in jih najdemo v bližini ali celo v samih koreninah. Med bakterije, ki kolonizirajo površino korenine in se po vsem svetu uporabljajo z namenom povečanja rastlinske biomase, spadajo tudi bakterije iz rodu *Klebsiella* (Kennedy in sod., 2004). Mehanizmi, ki jih bakterije uporabljajo za promocijo rasti rastlin, vključujejo fiksacijo dušika, sintezo sideroforov in s tem privzem železa v rastlino, proizvodnjo fitohormonov, kot so avksini in citokini ter raztapljanje mineralov. Poleg tega pa lahko znižajo nivo etilena v rastlinah, ki nastane ob stresu in s tem omogočijo razvoj daljših korenin (Burd in sod., 2000). Rizobakterije lahko tudi neposredno vplivajo na mobilnost in biodostopnost kovin tako, da sproščajo kelatorje, spremenijo njihove kemijske lastnosti, kot so pH in redoks stanje (Abou-Shanab in sod., 2003).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti kakšen vpliv ima bakterija *Klebsiella oxytoca* na rast in razvoj sončnic (*Helianthus annuus*), ki rastejo na onesnaženi prsti. Sončnice so bile vzgojene na prsti, ki je mešanica klasičnega vrtnega substrata in prsti, pridobljene v Mežiški dolini. Tam je, zaradi dolgoletnega rudarjenja in predelovanja svinca, prst zelo onesnažena s svincem, prav tako pa tam najdemo tudi povišane vsebnosti cinka in kadmija. Predpostavili smo hipotezo, da bo rastlina privzela višje koncentracije različnih mineralov in s tem tudi težkih kovin. Ker pa rizobakterije promovirajo rast rastlin z različnimi mehanizmi, tudi z detoksifikacijo kovin, akumulacija težkih kovin ne bo imela bistvenega negativnega učinka na rastline.

Metode in materiali

Uporabili smo semena navadne sončnice (*Helianthus annuus*), ki smo jih posadili v lončke z zemljo onesnaženo s svincem, cinkom in kadmijem, pridobljeno iz Mežiške doline. Sadike smo 5 tednov gojili v rastni komori s stalnimi pogoji: temperatura: 21°C, zračna vlaga: 45%, fotoperioda: 16h svetlobe, 8h teme. Kalili smo 3 serije (serije: kontrola, dodane žive bakterije, dodane avtoklavirane bakterije), 5 lončkov za vsako serijo, v vsakem lončku po 5 semen. Po 14 dnevih smo število poganjkov zreducirali na 10 na serijo, torej dva poganjka na lonček. Pred sajenjem smo vzorčili prst za analizo vsebnosti težkih kovin. Pripravek z avtoklavirano bakterijo nam je predstavljal kontrolo, da preverimo vpliv bakterij na rast rastlin in ne snovi v mediju v katerem so bakterije rasle. Vse tri serije smo zalivali enkrat tedensko s 100 mL vode oz. z enakim volumnom 100x redčenega živega ali avtoklaviranega bakterijskega inokuluma (*Klebsiella oxytoca*) ter po potrebi še z vodovodno vodo.

Iz zemlje in obravnavanih rastlin smo pripravili tablete, ki smo jih potrebovali za določanje koncentracije kovin. Za vsako serijo smo izmerili vsebnosti svinca in cinka v poganjkih in koreninah rastlin. Vsebnosti kadmija nismo določali. Analizo vsebnosti izbranih kovin smo izvedli z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije (Peduzo T02, IJS). Izmerili in primerjali smo transpiracijo, učinkovitost fotosistema II, vsebnost pigmentov (klorofil A, klorofil B, karotenoidi) ter sveže in suhe mase korenin in poganjkov. Pridobljene podatke smo obdelali v R studiu, statistične razlike med skupinami smo določili z enosmerno analizo variance (ANOVA), post-hoc pa s Tukyevim testom. Podatke iz rentgenske fluorescenčne spektroskopije smo obdelali v programu Microsoft Office Excel z dodatkom XL Toolbox z metodo Dunnetovega testa.

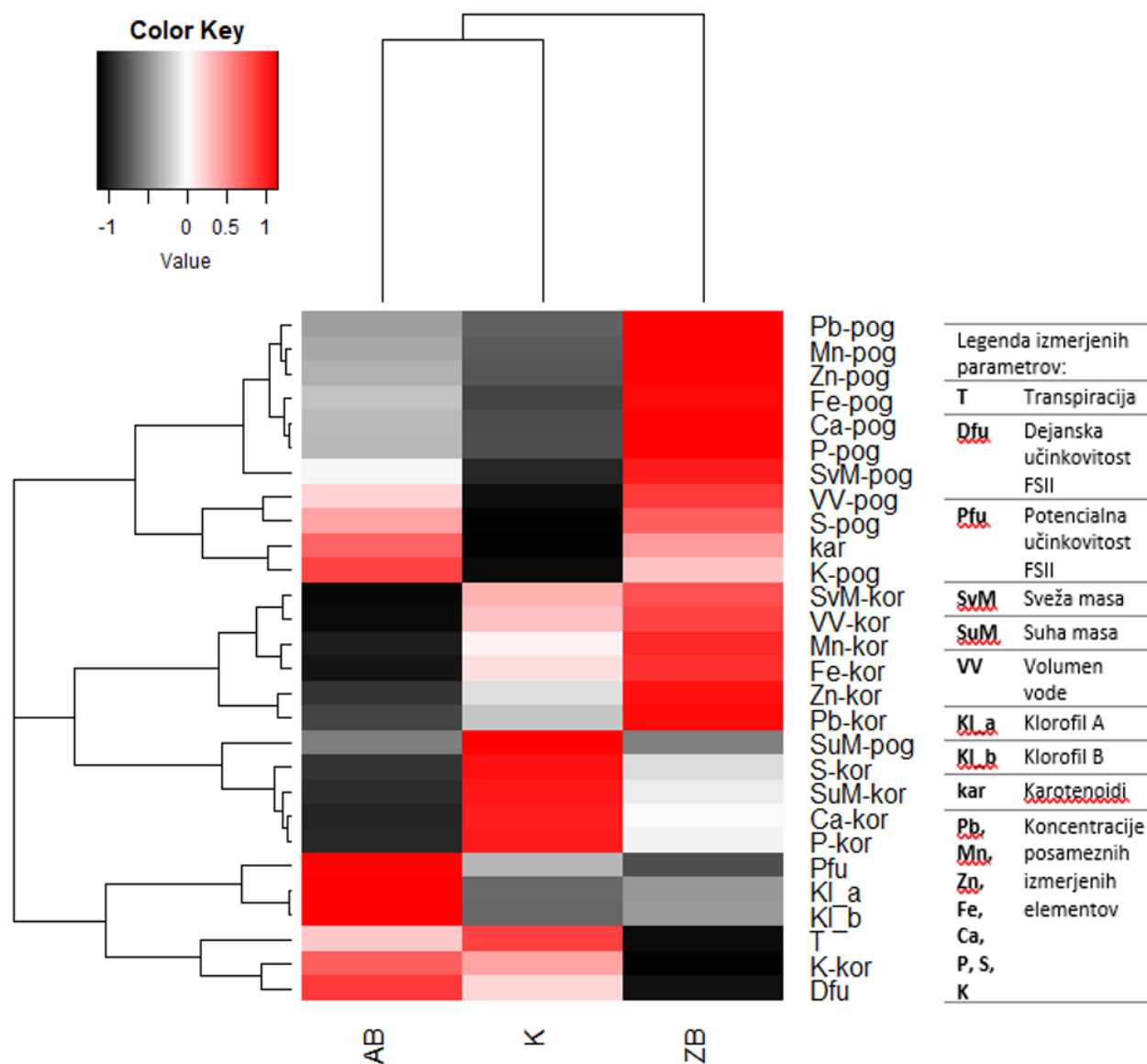


Slika 1: Nekroze listov pri kontrolni skupini.

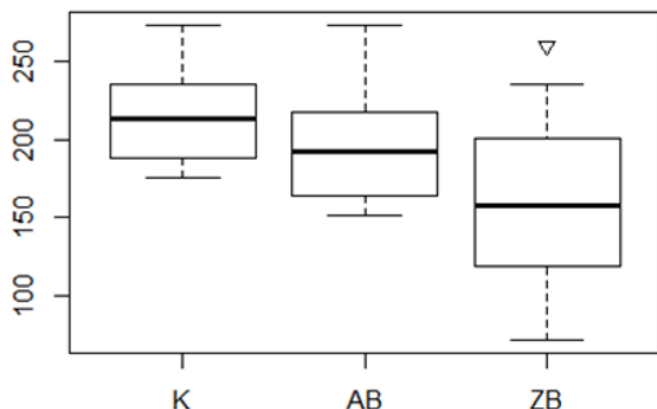
Rezultati in Diskusija

Pred začetkom opravljanja meritev smo rastline vizualno ocenili. Večina listov je bilo vidno nekrotičnih. Med samimi skupinami ni bilo vidnih razlik, veliko nekroze je bilo prisotne tako pri skupini inokulirani z živimi bakterijami, kot tudi pri skupini inokulirani z avtoklaviranimi bakterijami in kontroli. Sklepamo lahko da je za nekrozo kriva akumulacija Pb in Zn, saj je bila zemlja močno onesnažena s temi kovinami. Koncentracija cinka je znašala 495 $\mu\text{g/g}$, svinca pa 3302 $\mu\text{g/g}$. Prisotnost težkih kovin v rastlinskih tkivih moti številne fiziološke procese (Burd in sod., 2000) (Slika 1). Zaostala rast, kloroze in nekroze so vidni simptomi hude fitotoksičnosti kovin. Zn in Pb vplivata na celično delitev in rast, saj sta induktorja oksidativnih poškodb. Povišano prisotnost ROS lahko opazimo kot razbarvanje, deformacijo in zvijanje listov (Nagajyoti in sod., 2010; Senevirante in sod., 2017).

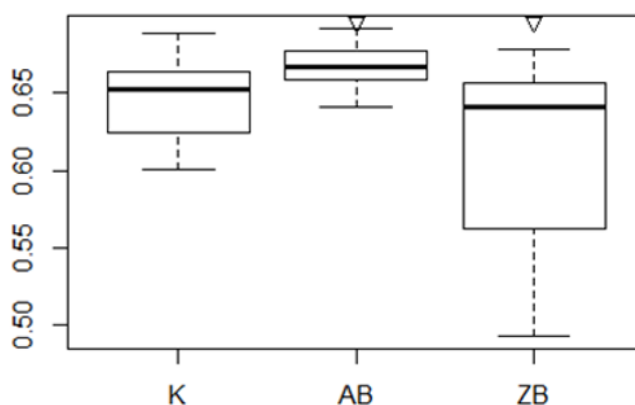
Veliko rizobakterij, ki jih najdemo okoli korenin, omogoča večjo dostopnost mineralnih hranil in pospešuje njihov privzem v rastline. Tako naj bi bakterije, ki promovirajo rast in razvoj rastlin, z različnim mehanizmi pomagale rastlini, da je njena rast čim bolj optimalna, kljub visoki akumulaciji težkih kovin v tkivih. Na grafu (Slika 2) lahko vidimo, da bakterije *Klebsiella oxytoca* res spodbudijo privzem številnih mineralov (Mn, Fe, Ca, P). Hkrati pa lahko pri skupini ŽB (žive bakterije) opazimo, da je prišlo tudi do povišanja koncentracije težkih kovin, kot sta Pb in Zn v primerjavi s skupino AB (avtoklavirane bakterije) in kontrolo. Višje koncentracije pri skupini ŽB lahko opazimo tako v koreninah, kot tudi v poganjkih. Različni mehanizmi, ki jih uporabljajo bakterije, so namreč vpleteni v izboljšanje stopnje akumulacije težkih kovin v rastlinah, saj izboljšajo njihovo mobilnost in privzem (Senevirante in sod., 2017). Ugotovitve naših poskusov se tako skladajo z našo hipotezo, da bodo bakterije promovirale privzem mineralov in hkrati tudi težkih



Slika 2: Primerjava izmerjenih parametrov med proučevanimi skupinami (ŽB- živa bakterija, AB- avtoklavirana bakterija, K- kontrola) v poganjkih (pog) in koreninah (kor).



Slika 3: Primerjava transpiracije med skupinami.



Slika 4: Primerjava dejanske fotosintezne učinkovitosti FSII med skupinami.

kovin.

Zaradi prevelikih koncentracij težkih kovin (Zn, Pb) je prišlo do negativnega vpliva na nekatere fiziološke parametre. To se ne sklada z drugim delom naše hipoteze, kjer smo predvidevali, da bakterije z različnimi procesi tudi razstrupljajo težke kovine, spodbujajo rast in razvoj rastlin in posledično akumulacija kovin ne bo imela negativnih učinkov na procese v rastlini. Primarni toksični mehanizmi težkih kovin spremenijo katalitično funkcijo encimov in poškodujejo celične membrane. Te spremembe povzročijo številne sekundarne učinke, kot so inhibicija fotosinteze, zmanjšan privzem hranil, hormonsko neravnovesje in vodni stres (Kastori in sod., 1992). Statistično značilne razlike opazimo pri transpiraciji (Slika 3) in dejanski učinkovitosti fotosistema II (FSII) (Slika 4). Tudi pri teh parametrih najbolj statistično odstopa skupina ŽB. Interakcija ionov težkih kovin s fotosintezni encimi in membranami kloroplastov vpliva na zmanjšanje fotosintezne aktivnosti. Težke kovine vplivajo tako na fotokemične kot nefotokemične reakcije. Neposredno vplivajo na redukcijo NADP in fotofosforilacijo, posredno pa na sintezo klorofila in na spremembe v razmerju med Chl A in Chl B. Slednjega ne moremo potrditi, saj pri nobeni skupini nismo zaznali statistično značilnih razlik pri vsebnosti klorofilov. Kovinska indukcija oksidativnih poškodb vpliva tudi na proteine in lipide, ki so neposredno vpleteni v elektronskem toku pri fotosintezi (Aggarwal in sod., 2011). Nalaganje težkih kovin v listih (predvsem svinca) negativno vpliva na normalno delovanje listnih rež. Poleg dejanske učinkovitosti FSII smo pri skupini ŽB opazili tudi zmanjšano transpiracijo. Vpliv kovin na odpiranje listnih rež bi lahko bila posledica sprememb v pretoku kalijevih ionov preko membrane ali pa posledica inhibicije energijskega sistema (Kastori in sod., 1992).

Med kontrolno skupino in AB nismo pričakovali statistično značilnih razlik, a jih vseeno lahko opazimo pri nekaterih fizioloških faktorjih. Do tega je verjetno prišlo zaradi dejstva, da so rastline z avtoklaviranimi bakterijami (AB) dobile več hranilnih snovi, kot pa rastline iz kontrolne skupine. Te hranilne snovi so prišle iz gojišča bakterij in bakterij samih. Pri skupini AB zaznamo največjo vsebnost klorofilov (Slika 2). Temu sovпада tudi graf (Slika 4), saj je pri tej skupini moč pri meritvah na svetlobi opaziti rahlo povišano dejansko učinkovitost FSII. Torej so rastline iz skupine AB zaradi dodatnih

hranil iz bakterijskih gojišč lahko bolje opravljale fotosintezo. Pridobljeni rezultati nakazujejo tudi na veliko variabilnost med samimi rastlinami. Ta je največja pri skupini ŽB (Slika 3 in Slika 4). To je bilo tudi pričakovano, saj smo na živ sistem (sončnice) vplivali z drugim živim sistemom (bakterije), kar povzroči bolj variabilen odgovor.

Bakterije sicer lahko delujejo kot bioremediatorji, a teh značilnosti pri našem poskusu nismo zaznali. To dejstvo odstopa od naše hipoteze. Za svinec je dokazano, da je lahko strupen za mikroorganizme tudi pri zelo nizkih koncentracijah. Svinec ima negativne učinke na mikrobo respiracijo. Večina encimov, ki so udeleženi pri denitrifikaciji, je lociranih v periplazemskem prostoru, blizu celične površine, kar še poveča njihovo občutljivost. Bakterije se lahko prilagodijo na visoke koncentracije kovin, tako da uporabijo odporne nitrat reduktaze (Sobolev in Begonia, 2008). Obstaja verjetnost, da je *Klebsiella oxytoca* skozi generacije kultivacije v umetnih pogojih, izgubila toleranco na težke kovine, zaradi česar je odmrla in tako ni pripomogla k izboljšani rasti rastlin. Tako je na začetni stopnji še omogočala večji privzem mineralnih hranil in težkih kovin, kasneje pa odmrla, zaradi česar s svojimi procesi ni mogla kompenzirati negativnih učinkov akumuliranih težkih kovin.

Še en razlog za odstopanje od naše hipoteze lahko tiči tudi v tem, da bakterija (*Klebsiella oxytoca*) in sončnica nista kompatibilni v teh razmerah. Prišlo je do hiperakumulacije težkih kovin, bakterija pa ni zagotovila dovolj dobre obrambe, da bi to hiperakumulacijo kompenzirala. Sama rastlina tudi nima nobenih posebnih mehanizmov na celičnem nivoju, ki bi ji omogočili toleranco na težke kovine. Mogoče bi ta vrsta bakterije sončnicam pomagala pri rasti v kakšnih drugih stresnih pogojih, kot sta npr. slanost ali suša; a v našem primeru onesnažene zemlje s težkimi kovinami, do tega ni prišlo.

Zaključki

Kljub precejšnji onesnaženosti prsti s težkimi kovinami, so rastline vseeno uspevale. Ena izmed bakterij, ki pomagajo rastlinam pri privzemu kovin, je bakterija *Klebsiella oxytoca*. Olajšan privzem je v našem primeru imel predvsem negativne vplive na merljive fiziološke parametre, kot so transpiracija in

dejanska učinkovitost fotosistema II. Opazili smo manjše razlike med posameznimi skupinami, a bi za gotovost o uspešnosti poskusa le-tega verjetno morali večkrat ponoviti. Zaskrbljujoče pa je dejstvo, da je prst iz Mežiške doline res tako onesnažena, saj so rastline v vseh skupinah že navzven pokazale vplive onesnaženosti s težkimi kovinami. Menimo, da bi se v bodoče morali bolj osredotočiti na ta problem in poiskati možne rešitve.

Zahvala

Zahvalili bi se radi vsem, ki so nam omogočili izvedbo projektne naloge pri predmetu Rast in razvoj rastlin. Asistentki in izredni profesorici dr. Katarini Vogel-Mikuš za idejno zasnovo in pomoč pri izvedbi projekta ter pri interpretaciji rezultatov, tehnični sodelavki Mileni Kubelj za nenehno pripravljenost pri nastavitvi in izvedbi poskusov ter prof. dr. Marjani Regvar za mentorstvo.

Literatura

1. Abou-Shanab R.A., Angle J.S., Delorme T.A., Chaney R.L., van Berkum P., Moawad H., Ghanem K., Ghazlan H.A., 2003. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytologist*, 158(1): 219-224
2. Aggarwal A., Sharma I., Tripathi B.N., Munjal A.K., Baunthiyal M, Sharma V. 2011. Photosynthesis: Overviews on Recent Progress & Future Perspective, Edition: First, Chapter: Metal toxicity and Photosynthesis, Publisher: IK International Publishing House. New Delhi, pp.16: 229-236
3. Burd G., Dixon D. G., Glick B. R. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol*, 46: 237–245
4. Chandra R., Kang H. 2016. Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrid., *Forest Science and Technology*, 12(2): 55-61
5. Ghosh M., in Singh S. P. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian Journal of Energy & Environment*, 3(1): 1-18
6. Kastori R. , M. Petrović M.. Petrović N. 1992. Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower. *Journal of Plant Nutrition*, 15(11): 2427-2439
7. Kennedy I.R., Choudhury A., KecSkcs M. L. 2004. Non-Symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8): 1229-1244
8. Kong Z., Glick B. R. 2017. The Role of Bacteria in Phytoremediation: Innovations and Future Directions. *Advances in Microbial Physiology*, 71: 97 - 131
9. Li W.C., Ye H., Wong M.H. 2007. Effects of bacteria on enhanced metal uptake of the Cd/Zn-hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. *Journal of Experimental Botany*, 58(15/16): 4173 - 4182
10. Loeffler S., Hochberger A., Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H. 1989. Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Letters*, 258 : 42–46
11. Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett*, 8:199-216
12. Reichman S. M. 2002. The Responses of Plants to Metal Toxicity: A Review Focusing on Copper, Manganese & Zinc. Melbourne, The Australian Minerals & Energy Environment Foundation: 23.
13. Senevirante M., Senevirante G., Madawala H.M.S.P., Vithanage M. 2017. Role of Rhizospheric Microbes in Heavy Metal Uptake by Plants. *Agro*
14. Sharma P., Dubey R. S. 2005. Lead Toxicity in Plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1): 35-52
15. Sobolev D., Begonia M.F.T. 2008. Effects of Heavy Metal Contamination upon Soil Microbes: Lead-induced Changes in General and Denitrifying Microbial Communities as Evidenced by Molecular Markers. *Int. J. Environ. Res.*, 5(5): 450-456

Vpliv hladne kisikove plazme na glivno sestavo semen ječmena (*Hordeum vulgare*)

Urša Miklavčič, Rebeka Podgrajšek, Karmen Treven, Jure Zaman, Špela Zupančič

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Določili smo raznolikosti in število glivnih vrst, ki se nahajajo na in v semenih ječmena po njihovi obdelavi s hladno plazmo v primerjavi s kontrolo.
- Semena smo različno dolgo izpostavili hladni plazmi. Cela in razpolovljena semena smo nato prenesli na PDA gojišče in opazovali glivno kolonizacijo. Ocenili smo stopnjo kolonizacije in na podlagi DNA določili vrstno sestavo.
- Pri izpostavitvi ječmenovih semen hladni plazmi tudi pri najdaljšem izpostavitvev, ki je 120 sekund, ne pride do uničenja gliv na površini semen. Predvidevamo, da do tega pride zaradi velikosti in strukture semenske ovojnice, ki vplivata na učinkovitost hladne plazme pri uničenju gliv.

Ključne besede: hladna kisikova plazma, glive, ječmen

Uvod

Ječmen (*Hordeum vulgare*) spada med najstarejša gojena žita na svetu. Pridelujejo ga v različnih podnebnih območjih, saj je zelo prilagodljivo žito. Uporabljamo ga za krmo živine, prehrano ljudi in za proizvodnjo slada (Ječmenov profil, 2020). Ječmen je eno izmed najpomembnejših žit na svetu z ocenjeno globalno proizvodnjo 141 milijonov ton letno. Industrijska uporaba ječmenovega žita stalno raste predvsem na račun svojega gospodarskega pomena v pridelavi slada, vendar je žito pogosto kontaminirano z glivami, kar znižuje kakovost zrnja in posledično vpliva na končni izdelek ter vodi v ekonomske izgube (Piacentini in sod., 2015). Glivne kontaminacije kmetijskih pridelkov povzročajo svetovno gospodarsko breme, zaradi izgube pridelka, kakovosti in stroškov, povezanih s prisotnostjo strupenih glivnih sekundarnih metabolitov (Bokulich in sod., 2017).

Obdelava semen s hladno kisikovo plazmo dokazano uniči površinske kontaminante in zavira rast neželenih patogenov v semenu. Z uporabo hladne kisikove plazme lahko odstranimo mikroorganizme (dekontaminacija) brez uporabe škodljivih kemikalij in tako potencialno zaščitimo semena med skladiščenjem in prevozom (Zahoranová in sod., 2018). Nizkotemperaturna kisikova plazma je ioniziran kisik, ki ga lahko generiramo z uporabo mikrovalov, radijske frekvence, pulzirajočega ali alternativnega toka v različnih nastavitvah, kot je dielektrična pregrada, plazemski curek pri atmosferskem tlaku in korona izpusti. Tako dobimo težke delce (ione, molekule), ki imajo nizko temperaturo in so zato bolj primerni za površinsko obdelavo občutljivih bioloških materialov, ter lahke delce (elektrone), ki s svojo visoko temperaturo povzročijo nastanek različnih reaktivnih dušikovih in kisikovih zvrsti in UV sevanje, ki učinkovito deluje pri dekontaminaciji in sterilizaciji površin (Sivachandiran in sod., 2017).

Pri skladiščenju in transportu semen ječmena lahko prihaja do kontaminacije z glivami, ki vpliva na kaljivost, viabilnost in užitnost semena. Naš cilj je bil, da preverimo, ali lahko z obdelavo z nizkotemperaturno kisikovo plazmo, zaščitimo seme ječmena pred neželenimi okužbami z glivami.

Hipoteze

- Nizkotemperaturna plazma negativno vpliva na preživetje gliv na semenu ječmena.
- Z daljšim časom obdelave semena ječmena z nizkotemperaturno plazmo bo število različnih vrst gliv manjše.
- Z daljšim časom obdelave semena ječmena z nizkotemperaturno plazmo bo razrast gliv manjša.
- Po obdelavi z nizkotemperaturno plazmo bo na ploščah z razrezanimi semeni razrast in število gliv na semenih ječmena večje.

Metode in materiali

Semena ječmena (*Hordeum vulgare*) (Emona, Ljubljana) smo prešteli v skupine po 30 semen v različne vrečke, ki smo jih nato označili kot: kontrola, 30s, 60s, 90s in 120s obdelave s plazmo. Na Inštitutu Jožefa Stefana so semena obdelali s hladno plazmo, po obdelavi so jih sterilno vakuumsko zapakirali v vrečke. Med tem smo mi pripravili bogata gojišča PDA (potato dextrose agar) z dodanim antibiotikom kloramfenikol v koncentraciji 50 mg/L.

Iz vsake vrečke smo po 8 celih semen sterilno položili na

plošče z gojiščem PDA, 8 pa smo jih razpolovili in dali obe polovici na isto gojišče, vse plošče smo ovili s plastično folijo. Plošče smo nato dali v škatlo, ki ni prepuščala svetlobe. Plošče smo shranili v rastnih komorah, kjer je stalna temperatura 23°C. Nato smo dnevno spremljali razvoj glivne razrasti. Po 6 dneh so glive zrasle dovolj, da smo precepili vsak posamezni morfološki tip na svojo ploščo. Pred precepljanjem smo ocenili stopnjo kolonizacije ter na podlagi morfoloških značilnosti ocenili število vrst gliv, ki so kolonizirale posamezno seme. Za oceno kolonizacije smo uporabili petstopenjsko lestvico, ki je temeljila na ocenjenem procentnem deležu razrasti na plošči. Z 0 smo označili gojišča, kjer ni bilo opažene rasti, z 1 smo označili 1- 25 % razrast, z 2 smo označili 25 - 50 % razrast, s 3 smo označili 50 - 75 % razrast in z 4 (najvišja stopnja) gojišča, ki so bila z glivami prerasla več kot 75 %. Plošče smo tudi slikali. Rezultate smo nato obdelali s programom Statistica 7.0., v katerem smo naredili tudi analizo variance s testom ANOVA in prikazali podatke z grafi s pomočjo programa Microsoft Excel. Tiste, ki so morfološko delovale različne smo precepili, če so se pojavljale enake smo jih precepili iz več različnih plošč, odvisno na koliko različnih ploščah so rastle. Po štirih dneh inkubacije v rastni komori, smo jih precepili do monokulture. Ko je bilo kulture dovolj, smo jih pripravili za izolacijo DNA po kompletu GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit, proizvajalca Sigma.

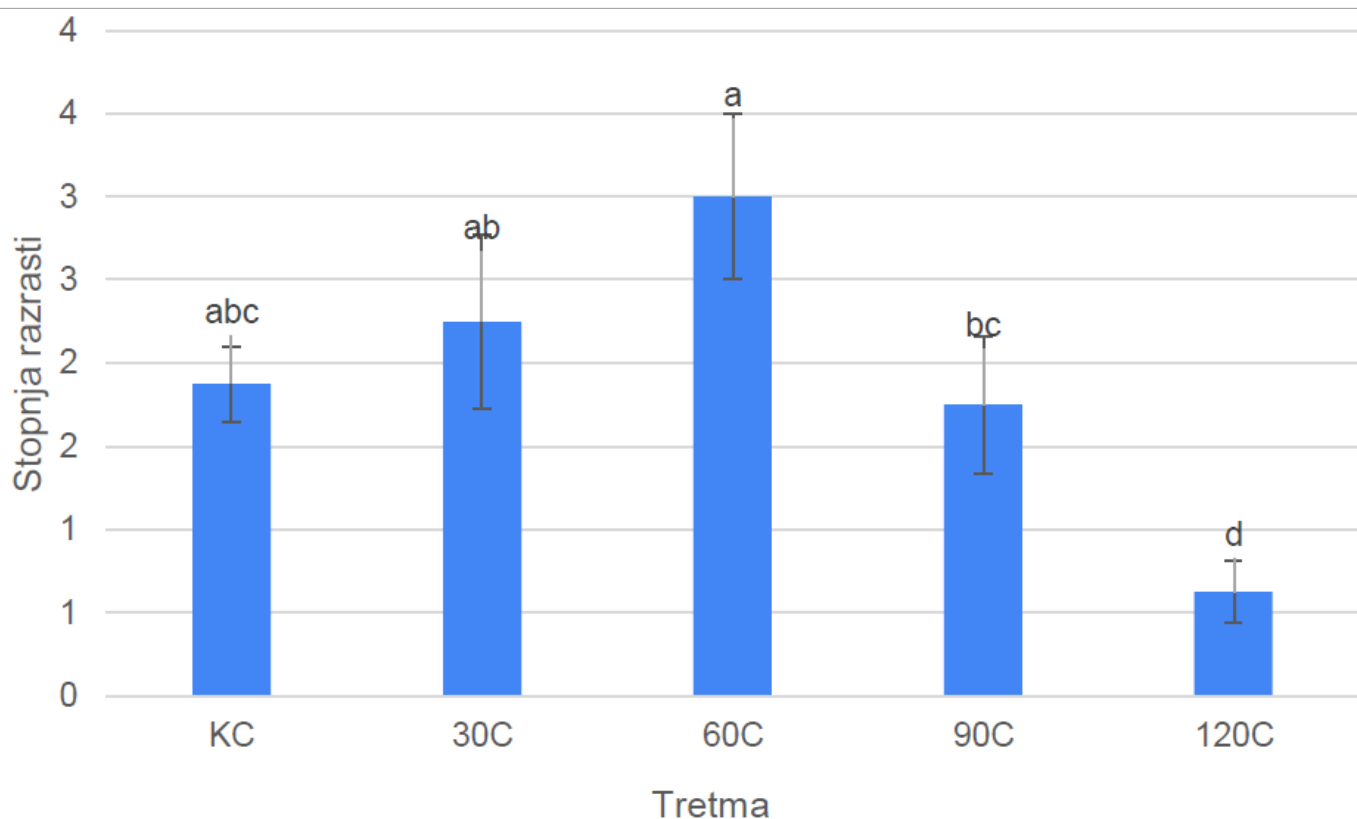
Rezultati

Opazimo, da se pri celih semenih statistično značilno zmanjša razrast pri 120 sekundni obdelavi s hladno plazmo v primerjavi s kontrolo (Slika 1), medtem ko pri razrezanih semenih ni statistično značilne razlike, saj hladna plazma ne vpliva na sestavo ali količino gliv pod semensko ovojnico. Pri prerezanih semenih smo zajeli vse glive nekega semena, in bi jih torej moralo biti več, ker so se aktivirale še spore pod semensko ovojnico. Statistično pomembno se razlikuje le izpostavitve 120C, kjer lahko opazujemo zmanjšano razrast gliv na ploščah s celimi semeni, ki so bila obdelana z nizkotemperaturno kisikovo plazmo 120 sekund (Slika 2). Statistično pomembne razlike se pojavijo le med izpostavitvama KR in 120R ter med izpostavitvama 90R in 120R. Pri izpostavitvi 120R je opazna zmanjšana razrast gliv na ploščah z rezanimi semeni, ki so bila obdelana z nizkotemperaturno kisikovo plazmo 120 sekund.

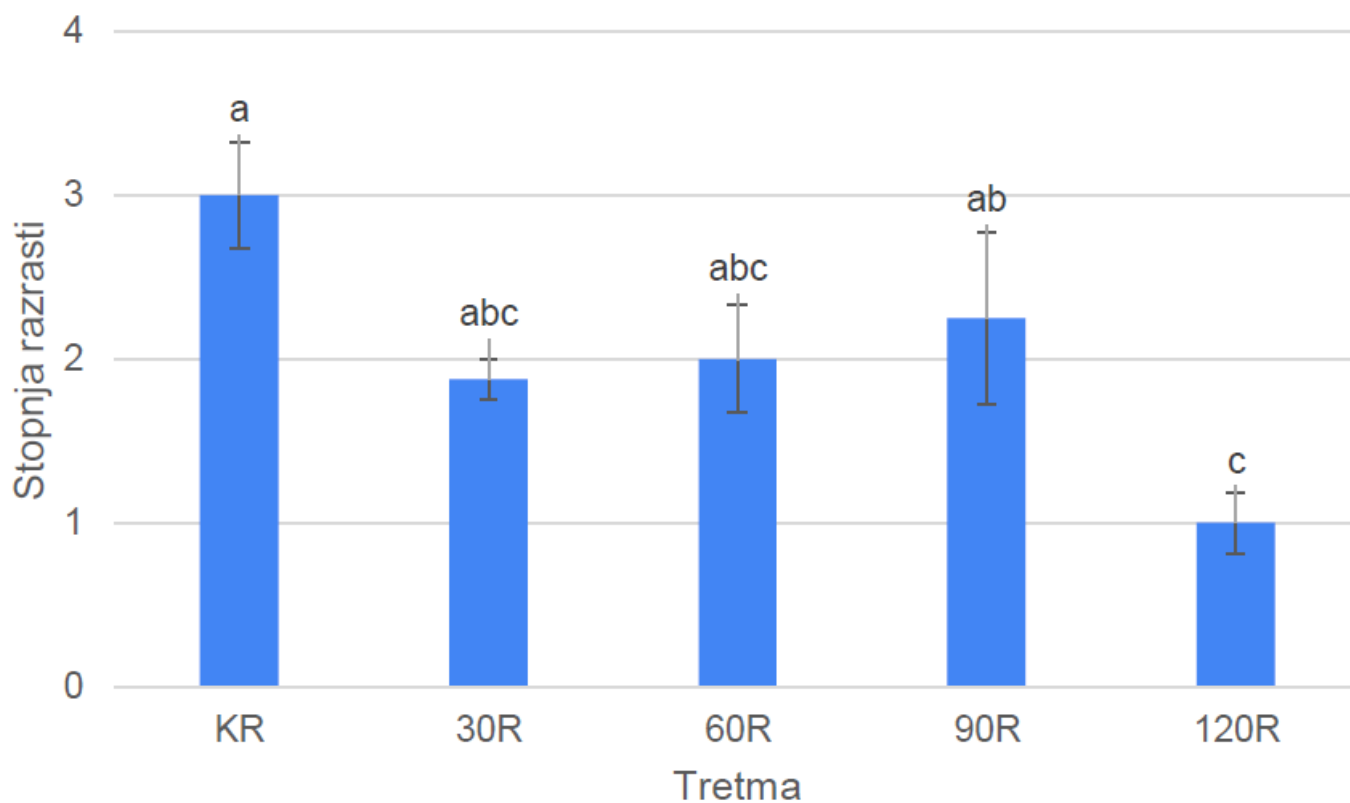
Diskusija

Predvidevamo, da je vpliv nizkotemperaturne kisikove plazme na uničenje gliv odvisen tudi od velikosti semena, po izkušnjah iz našega laboratorija na manjše deluje bolje in hitreje ter jih lahko tudi uniči, na večje pa počasneje. Ker je seme ječmena relativno veliko in ima ovoj, je to najverjetneje onemogočilo delovanje nizkotemperaturne plazme, torej na uničenje mikroorganizmov na njegovi površini. Ta problem bi morda lahko rešili tako, da bi poskus nadaljevali še z daljšim časom izpostavitve semen nizkotemperaturni kisikovi plazmi. Hkrati pa obstaja tudi možnost, da smo nekatere spore aktivirali s samo izpostavitvijo semen hladni plazmi (Veerana in sod., 2019)

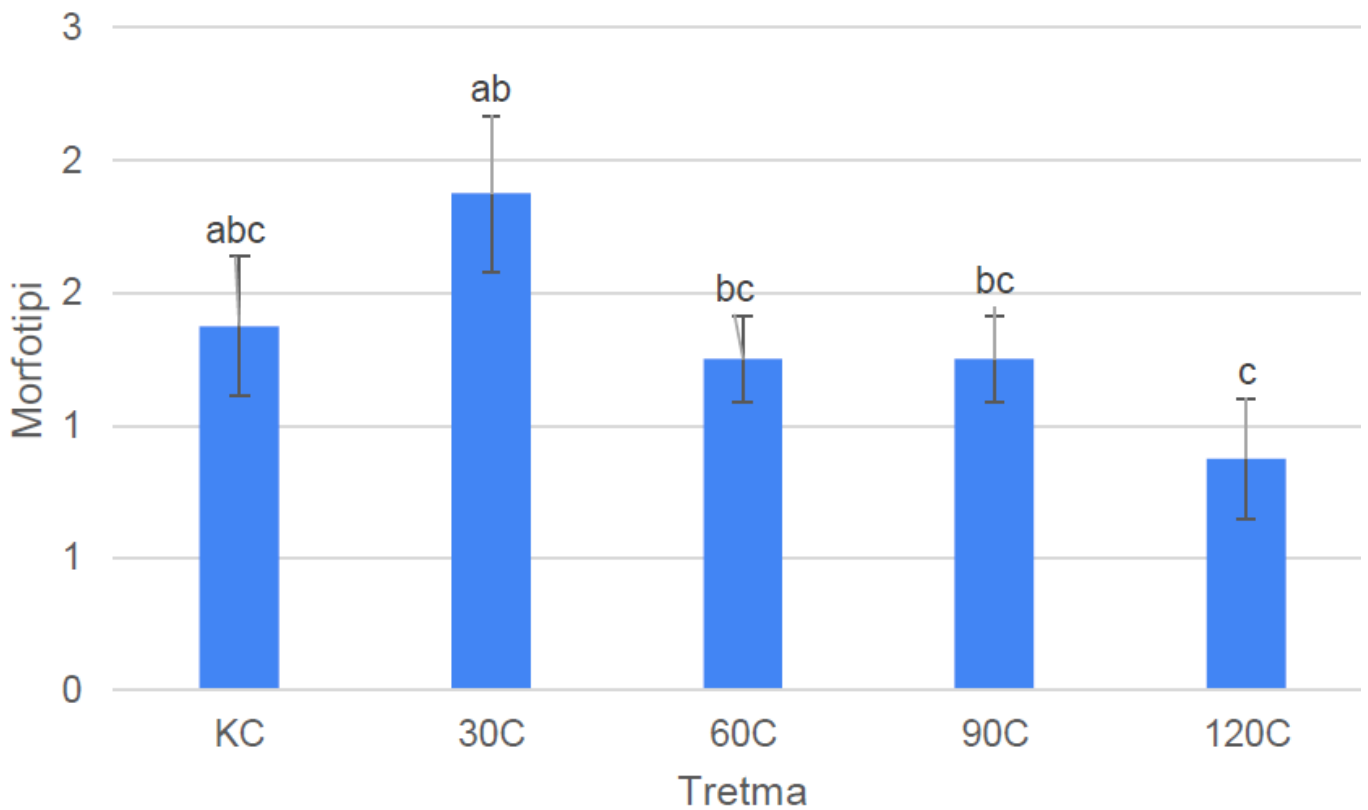
Vpliv vrste semena na učinek plazme nakazujejo tudi Los in sod. iz študije z leta 2018. Za tretiranje ječmenovih semen so uporabili nizkotemperaturno atmosfersko plazmo ter daljše čase izpostavitve plazmi. V primerjavi z nizkotemperaturno kisikovo plazmo je pri nizkotemperaturni atmosferski plazmi



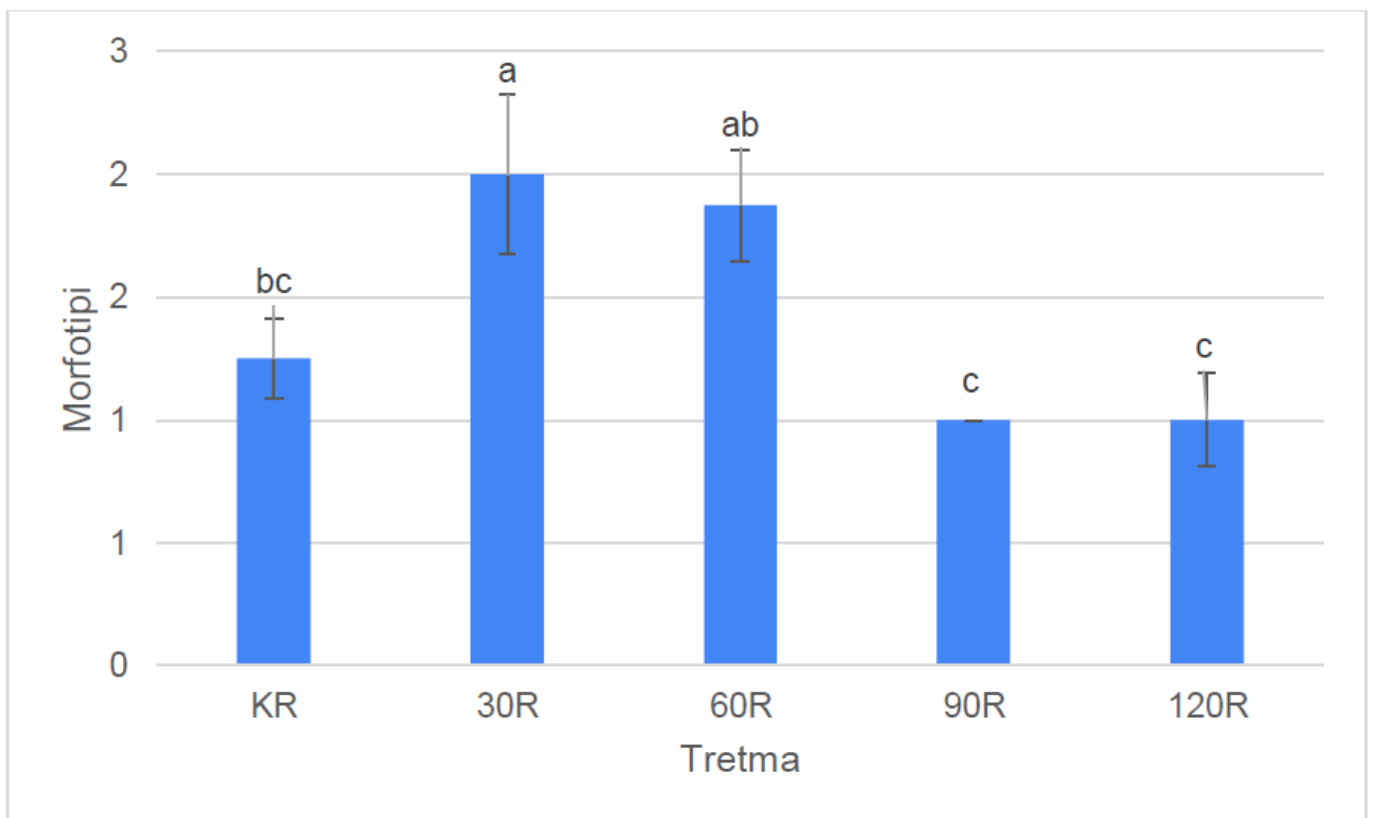
Slika 1: Za vse grafe velja naslednje: Oznaka C označuje semena, ki smo jih na gojišče položili cela, R označuje semena, ki smo jih na gojišče položili razpolovljena, K označuje kontrolno skupino. Številka označuje čas (sekunde) izpostavljenosti semena plazmi. Z rdečo so prikazane stopnje razrasti pri različnih izpostavitvah celih semen. Povprečna razrast gliv v odvisnosti od izpostavitve pri celih semenih ječmena. Pri 60s je razrast največja, pri 120s pa najmanjša.



Slika 2: Povprečna razrast gliv v odvisnosti od izpostavitvi pri razrezanih semenih ječmena.



Slika 3: Slika prikazuje število morfortipov gliv v odvisnosti od izpostavitve pri celih semenih ječmena. Statistično pomembno se razlikujeta le izpostavitvi 30C in 120C.



Slika 4: Slika prikazuje število morfortipov v odvisnosti od izpostavitve pri razrezanih semenih ječmena. Statistično pomembne razlike so med izpostavitvami KR in 30R, med 30R in 90R ter med 30R in 120R.

uporabljenih več plinov, s čimer poleg kisikovih radikalov dobimo tudi dušikove radikale. Za nastanek plazme je bila v raziskavi uporabljena napetost 80 kV. Največja učinkovitost v zmanjšanju mikrobiote je bila po 20 minutah. Raziskava navaja tudi vlogo strukturne površine semena pri občutljivosti na hladno plazmo. Površina ječmenovega semena naj bi bila groba, porozna in ne ravna. Krivine na semenu naj bi omogočile boljše pritrđitev mikroorganizmov na površino, kar naj bi bil eden od faktorjev za zmanjšano učinkovitost metode pri ječmenu. V eni od tujih študij je bila pri gladkih semenih, kot je kuzuza, učinkovitost plazme večja kot pri ječmenu. Pri kuzuzi so bili, za zmanjševanje rasti bakterij in gliv, učinkovite že izpostavitve po 5 minut, medtem ko je bilo pri ječmenu za opazni učinek potrebnih 10 oz. 20 minut (Brasoveanu in sod., 2015). Los in sod. navajajo tudi zmanjšanje kvalitete semena pšenice po 20 minutni izpostavitvi s plazmo. Na podlagi teh rezultatov bi bilo potrebno spremljati tudi viabilnost in kaljivost semen po obdelavi s plazmo, da bi videli ali so semena po obdelavi sploh še uporabna za kmetijstvo. Ker pa je bila pri raziskavah z leta 2018 in 2015 uporabljena nizekotemperaturna plazma, pri kateri uporabljen plin ni bil izključno kisik, bi bila primerjava lahko neustrezna. Potrebno bi bilo podaljšati čas izpostavitve semen nizekotemperaturni kisikovi plazmi na čas 20 min. S tem bi lahko primerjali učinke nizekotemperaturne kisikove ter nizekotemperaturne atmosferske plazme.

Na prerezanih semenih smo pričakovali večjo razrast gliv oziroma več morfotipov, saj lahko v semenu bivajo endofiti, ki se v primeru celega semena ne razrastejo, vendar moramo upoštevati, da z našim poskusom nismo zajeli celotne združbe gliv, ki so sobivale s semenom, saj smo opazili zgolj tiste, ki jih lahko gojimo na PDA gojišču.

Naše ocene razrasti so subjektivne, saj razrasti nismo merili in ocenjevali z računalniškimi programi, poleg tega meje razrasti gliv niso natančne. Upoštevati bi morali tudi dejstvo, da razrast vseh vrst gliv ni enako hitra in da nekatere glive ne rastejo na PDA gojišču.

Ječmen naj bi imel tudi v epikutikularni plasti semenske lupine in v samem jedru semena alkil resorcinole, ki bi naj vplivali na manjšo občutljivost na glivne patogene. To bi lahko bila tudi delna razlaga za manjšo rast gliv (García in sod., 1997).

Zaključki

Pri razrasti gliv na ploščah z rezanimi semeni se sicer kaže trend zmanjšane razrasti ob daljši izpostavitvi kisikovi plazmi, vendar razlike niso statistično pomembne.

Tudi pri morfotipih gliv bi lahko rekli, da se kaže trend upada števila morfotipov ob daljši izpostavitvi, vendar ponovno razlike niso statistično pomembne.

Hipotez ne moremo potrditi, saj rezultati in razlike niso statistično pomembni.

Literatura

1. Agmrc: Barley Profile (Ječmenov profil) <https://www.agmrc.org/commodities-products/grains-oilseeds/barley-profile> (15.2.2020)
2. Bokulich N.A., Bamforth C.W. 2017. Brewing Microbiology Current Research. Omics and Microbial Ecology. Caister Academic Press. 197-244.
3. Brasoveanu M., Nemtanu M. R., Surdu-Bob C., Karaca G., Erper I. 2015. Effect of Glow Discharge Plasma on Germination and Fungal Load of Some Cereal Seeds. Romanian Reports in Physics, 67(2), 617-624.

4. García S., García C., Heinzen H. in Moyna P. 1997. Chemical basis of the resistance of barley seeds to pathogenic fungi. Phytochemistry, 44(3), 415-418.
5. Los A., Ziuzina D., Akkermans S., Boehm D., Cullen P. J., Van Impe J., Bourke P. 2018. Improving microbiological safety and quality characteristics of wheat and barley by high voltage atmospheric cold plasma closed processing. Food Research International, 106, 509-521.
6. Piacentini K. C., Savi G. D., Pereira M. E. V. in Scussel V. M. 2015. Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). Food Chemistry. 187, 204-209.
7. Sivachandiran L. in Khacef A. 2017. Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. RSC Advances. 7(4), 1822-1832.
8. Veerana M., Lim J.S., Choi E.-H. in Park G. 2019. *Aspergillus oryzae* spore germination is enhanced by non-thermal atmospheric pressure plasma. Scientific Reports. 9(1).
9. Zahoranová A., Hoppanová L., Šimončicová J., Tučeková Z., Medvecká V., Hudecová D., Kaliňáková B., Kováčik D., Černák M. 2018. Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Maize Seeds: Enhancement of Seedlings Growth and Surface Microorganisms Inactivation. Plasma Chemistry and Plasma Processing. 38(5), 969-988.

Vpliv nizkotemperaturne plazme na pojavljanje gliv na semenih paradižnika (*Solanum lycopersicum*)

Pia Golob, Matej Milijaš Jotić, Matevž Jus, Jernej Počič, Melisa Topčagić

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- želeli smo ugotoviti vpliv nizkotemperaturne plazme (NTP) na združbo endofitskih gliv v in na semenih paradižnika. Predvidevamo, da višja intenziteta plazme in daljša izpostavitve semen uniči večje število endofitskih gliv.
- ob tehnični pomoči sodelavcev Inštituta Jožef Stefan smo semena in sadež izpostavili različnim časovnim obdobjem NTP. Za inkubacijo semen in delov sadeža smo uporabili gojišča PDA (Potato Dextrose Agar). Za vsako izpostavitve smo uporabili 4 cela in 4 prerezana semena. Na vsako petrijevko smo položili po eno seme. Semena smo inkubirali v temi pri sobni temperaturi v rastni komori. Pri sadežu smo uporabili lupino, meso in osemenje – za vsako izpostavitve 4 vzorce lupine in 3 vzorce mesa in osemenja. Vsak kos (1x1 cm) smo položili na svojo petrijevko.
- različne časovne izpostavljenosti plazmi pri semenih niso podali pričakovanih rezultatov. Večina kontrolnih semen je bila brez rasti gliv, spet drugi izpostavitve višjih intenzitet so imeli rasti preveč. Te pripisujemo kontaminacijam. Prav tako pričakovanih rezultatov nismo dobili pri različno obdelanih celih sadežih paradižnika.

Ključne besede: *Solanum lycopersicum*, nizkotemperaturna plazma, endofitske glive, Ascomycota

Uvod

Paradižnik (*Solanum lycopersicum*) je v svetu ena izmed najbolj pomembnih in tudi najbolj priljubljenih kulturnih rastlin. Da bi zadostili potrebam prebivalstva, moramo uporabljati nove tehnike za povečanje pridelka, med katere spada tudi moderna tehnika obdelave rastlin z nizkotemperaturno plazmo (NTP). Plazma so delno ionizirani plini, t. i. četrto agregatno stanje (poleg trdnega, tekočega in plinastega). Prednost NTP je v tem, da je "hladna", kar pomeni, da deluje pri sobni temperaturi in se lahko proizvaja pri normalnem atmosferskem tlaku. Sestavljena je iz različnih snovi, kot so fotoni, prosti elektroni in vzbujeni atomi z nevtralnim nabojem (Dey in sod. 2016). Nizkotemperaturna plazma se je izkazala za uspešno metodo inaktivacije mikrobov tako na svežih produktih kot semenih (Dey in sod. 2016). Metodo lahko uporabimo na različnih stopnjah produkcije kmetijskih izdelkov. Mednje spadajo tudi semena, pri katerih promoviramo klitje, hitrost rasti in zmanjšamo čas žetve. Točen mehanizem, kako plazma izboljša pridelek, še ni znan, ampak raziskave kažejo, da deluje na boljšo sposobnost absorpcije vode v seme, tvorbo reaktivnih zvrsti (NO), ki prekinejo dormanco semen, poškoduje določena semena, ki potrebujejo spremembe zunanje lupine za prekinitev dormance, in uniči mikroorganizme, ki povzročajo kontaminacije in poškodujejo semena (Los 2019, dostopno na: <https://www.technologynetworks.com/applied-sciences/articles/how-does-cold-plasma-enhance-seed-germination-and-plant-growth-325215>).

Največji problem pri proizvodnji rastlin je skladiščenje njihovih semen, saj so le ta podvržena različnim patogenom, ki zmanjšajo viabilnost. Okužba semen z glivami zmanjša vitalnost semen in pridelek (Kang in sod. 2015). Če razvijemo tehnike, s katerimi uspešno uničujemo oz. preprečujemo rast in razvoj patogenov na semenih, lahko bistveno vplivamo na razvoj agronomije. Okužba z glivami rodov *Aspergillus* in *Penicillium* naj bi namreč bila največji povzročitelj propada in »pokvarjenosti« semen, njihov vpliv pa ne zajema zgolj ekonomskega vidika, temveč tudi zdravstvenega, saj z nastajanjem mikotoksinov, ki kažejo potencialno zdravju škodljive lastnosti (Selcuk in sod. 2008). NTP pa vpliva tudi na druge lastnosti semen. V večini primerov krajše trajanje izpostavitve znatno vpliva na rastne parametre semena, medtem ko daljše izpostavitve lahko delujejo inhibitorno (Bourke in sod. 2017).

S pomočjo sodelavcev z Inštituta Jožefa Stefana smo semena in sadeže paradižnika obdelali z nizkotemperaturno plazmo. Pričakujemo, da ob daljši izpostavitvi plazmi zmanjšamo številčnost gliv na semenu, kakor tudi na sadežih. Pri semenih in sadežih po najdaljši izpostavljenosti (120 sekund) ne pričakujemo prisotnosti gliv.

Materiali in metode

Semena paradižnika smo pridobili iz kupljenih sadežev. Nesterelizirane in posušene smo poslali na Inštitut Jožef Stefan, kjer so jih obdelali z nizkotemperaturno plazmo pri intenziteti 3kV za različno časovno obdobje: 30 sekund, 60 sekund, 90 sekund in 120 sekund. V kontroli so bila uporabljena neobdelana semena. Za gojenje gliv smo uporabljali gojišče PDA z dodanim antibiotikom. Za vsako posamezno izpostavitve smo uporabili 4 cela in 4 prerezana semena. Vsako seme smo položili v svojo petrijevko (skupaj 40 petrijev). Semena smo

izpostavili temi na sobni temperaturi v rastnih komorah. Enako kot semena so na IJS obdelali tudi cele paradižnike. Iz posameznega različno obdelanega paradižnika smo vzeli približno 1x1 cm vzorca lupine, osemenja in mesa na 3 različnih mestih istega paradižnika. Delo smo prav tako opravljali sterilno, vzorce pa smo namestili na petrijevke z gojiščem PDA in dodanim antibiotikom. Kot pri semenih smo vzorce inkubirali na sobni temperaturi v temi.

Petrijevke s semeni in deli paradižnika smo 7 dni zapored opazovali in fotografirali ter ocenili razraslost na plošči z gojiščem. Različno vrsto gliv smo določali na podlagi morfologije kolonije, plošče z nečistočami in okužbami pa smo zavrgli.

Po opazovanju smo razrasle glive postrgali z gojišč in jih v terilnicah s pomočjo tekočega dušika pripravili za izolacijo DNA. V dveh primerih smo se odločili za raztapljanje agarja v vroči vodi in glive v tekoči obliki prenesli z gojišča. Izolacijo DNA smo izvedli po navodilih kita.

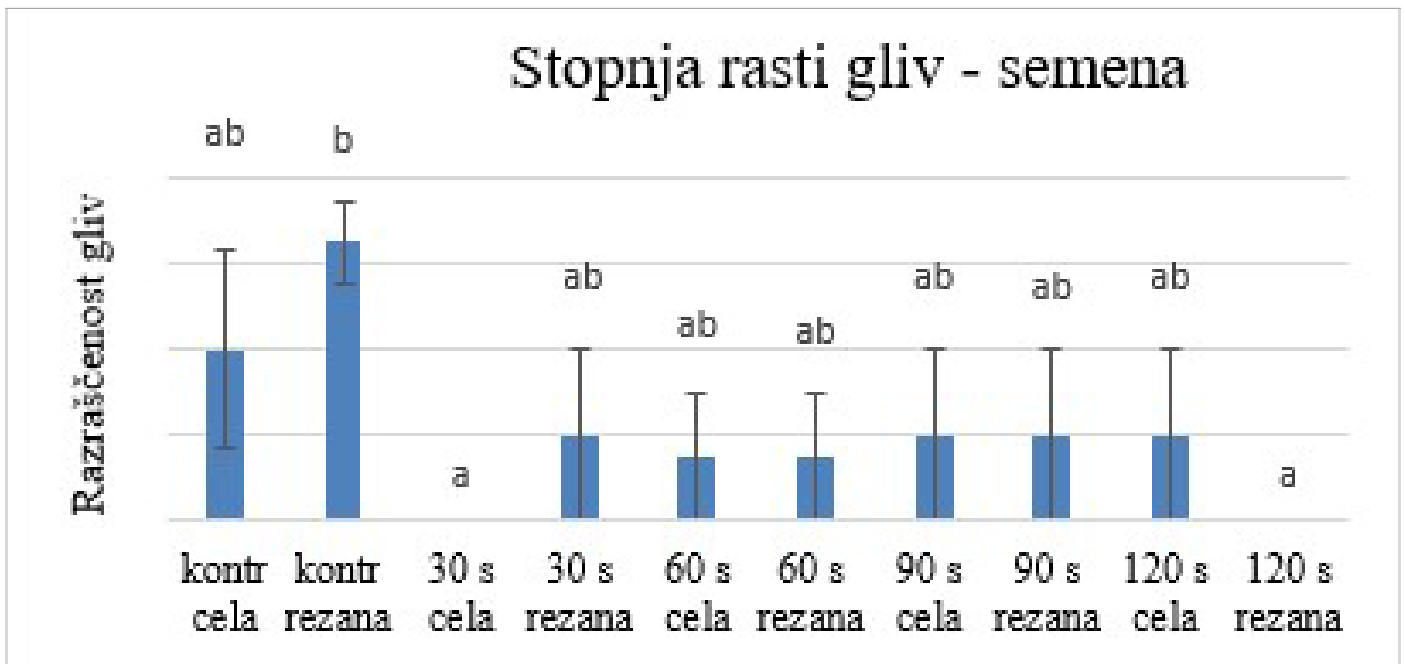
Na ploščah, kjer je bila rast gliv prisotna, smo ocenili številno morfoloških tipov gliv in preraščenost agarjeve plošče. Za preraščenost smo določili 4-stopenjsko lestvico, na kateri 4 pomeni 100 % preraščenost plošče, 3 pomeni 75 % preraščenost, 2 pomeni 50 % preraščenost plošče, 1 pa pomeni 25 % preraščenost plošče. Rezultate smo statistično obdelali s programom Statistika, in sicer smo določili povprečje, standardni odklon in standardno napako. Prav tako smo naredili enosmerno analizo varianc ANOVA.

Rezultati

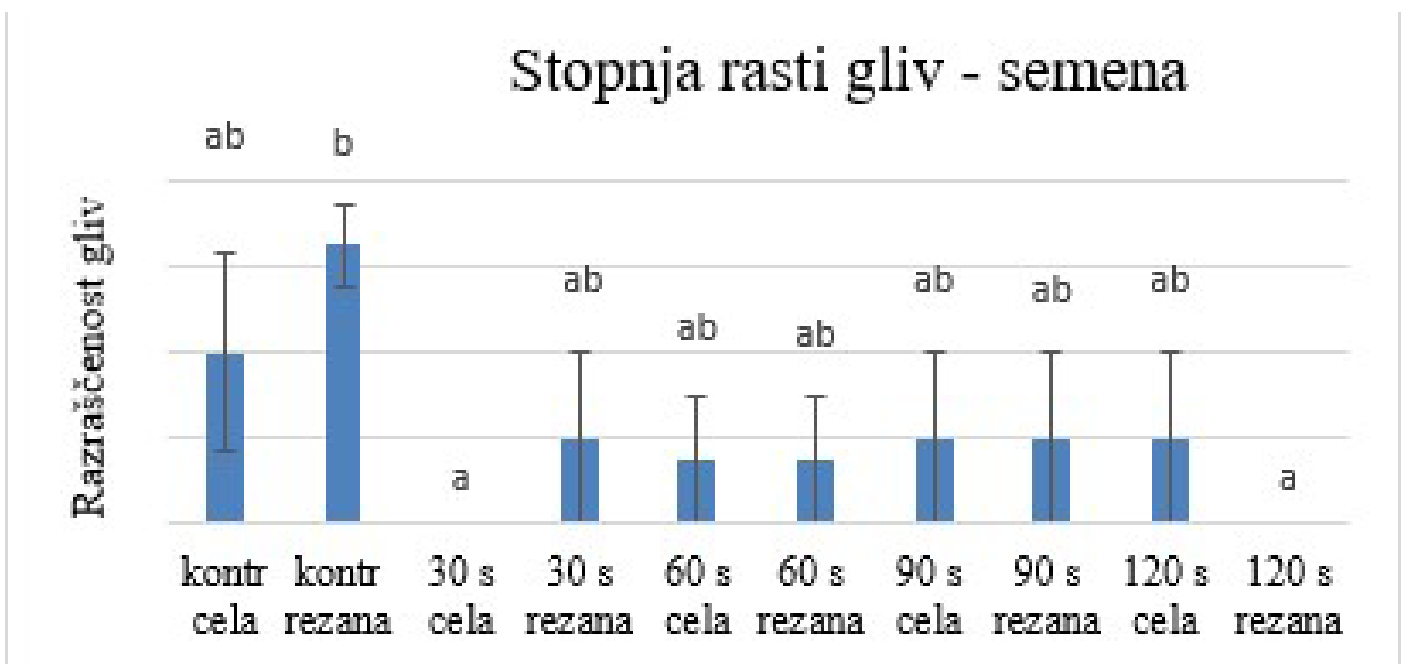
Statistično smo analizirali 5 različnih izpostavitvev (kontrola in štirje časovno različno dolge izpostavitve NTP) semen, lupine, osemenja in mesa paradižnika, kot je opisano v metodah. Z analizo ANOVA smo preverili, ali so si posamezne stopnje rasti gliv na različnih ploščah med seboj statistično različne oziroma podobne. Rezultati analize so predstavljeni v slikah 1–3.

Na semenih je bila rast gliv prisotna povsod, razen pri celih (nerezanih) semenih, ki so bila 30 sekund tretirana z NTP, in pri rezanih semenih obdelanih 120 sekund. Statistično različni so si med seboj le vzorci rezanih kontrolnih in za 30 sekund obdelanih semen ter celih semen, obdelanih za 120 sekund, kar je razvidno iz slike 1. Večinsko stopnjo rasti gliv na semenih smo pripisali kontaminaciji, ki smo jo od nekontaminirane rasti ločili po različnih znakih kot na primer pojavljanje specifičnih vrst gliv, označenih za kontaminante ter da središče oziroma izvor rasti ni bil na semenu, temveč na drugem delu plošče. Slika 2 prikazuje razraščanje gliv brez rasti tistih, ki smo jih označili kot kontaminante. Tu smo razraščanje opazili pri kontrolnih vzorcih in celih semenih, obdelanih za 90 s. Statistično značilno se razlikujejo vsi vzorci z izjemo kontrole rezanih in celih, za 90 sekund z NTP obdelanih semen.

Iz slike 3 lahko razberemo razraščanje gliv na posameznih delih paradižnika (lupina, osemenje, meso). Največjo rast smo zaznali na osemenju, obdelanem za 30 s. Razraščanje je bilo opaženo tudi na kontroli osemenja, lupini in mesu obdelanih za 30 s, ter mesu paradižnika obdelanim za 60 s. Statistično značilno se razlikujejo vsi vzorci, razen kontrole osemenja in mesa, obdelanega za 60 s.



Slika 1: rast vseh gliv na semenih paradižnika, s pripadajočimi standardnimi napakami. Na x osi so posamezne skupine izpostavitve semen paradižnika, na y osi razraščenenost gliv, kjer razraščenenost 4 pomeni popolno (100 %) prekritost plošče z glivami, razraščenenost 2 polovično (50 %) prekritost plošče in razraščenenost 0, da na plošči ni rasti gliv.



Slika 2: rast gliv na semenih paradižnika, brez gliv, ki so posledica kontaminacije vzorca med izvedbo poskusa, s pripadajočimi standardnimi napakami. Na x osi so posamezne skupine izpostavitve semen paradižnika, na y osi razraščenenost gliv, kjer razraščenenost 4 pomeni popolno (100 %) prekritost plošče z glivami, razraščenenost 2 polovično (50 %) prekritost plošče in razraščenenost 0, da na plošči ni rasti gliv.

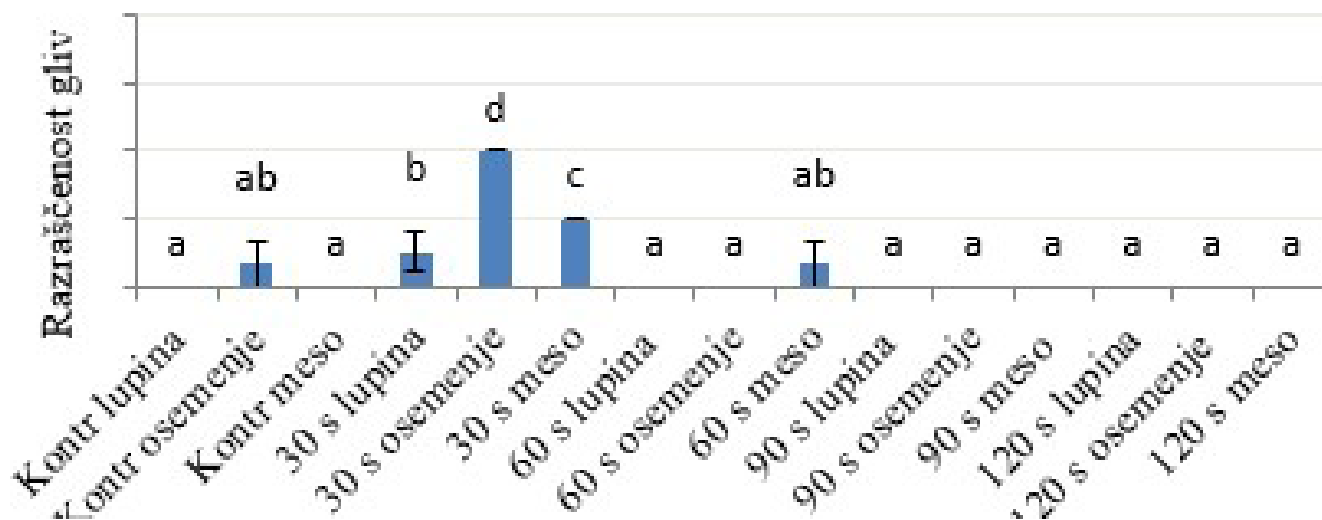
Diskusija

Spolšno je znano, da plazma zmanjša oziroma zavira rast mikroorganizmov vključno z glivami (Montie in sod. 2000). Poleg tega NTP omogoča boljše rast in ščiti rastlino pred biotskim in abiotskim stresom (Jiang in sod. 2014) in je učinkovitejša od konvencionalnih sterilizacijskih metod, ki se uporabljajo za uničevanje mikroorganizmov na površini

sadežev in semen (Thirumdas in sod. 2014; Zahoranova in sod. 2015). Prav tako je pomemben čas izpostavitve NTP, kjer ima daljša izpostavitve močnejše učinke, a imajo velik vpliv na inhibicijo patogenov že kratke izpostavitve (Surowski in sod. 2013; Niemira 2012).

Na podlagi tega smo pričakovali, da pri semenih in sadežih, obdelanih s plazmo, ne bomo zaznali rasti gliv oziroma da bo pri daljši izpostavitvi razraščenenost gliv na ploščah manjša.

Stopnja rasti gliv - cel paradižnik



Slika 3: rast vseh gliv na posameznih delih paradižnika (lupina, o semenje, meso), s pripadajočimi standardnimi napakami. Na x osi so posamezne skupine izpostavitve delov paradižnika, na y osi razraščanost gliv, kjer razraščanost 4 pomeni popolno (100%) prekritost plošče z glivami, razraščanost 2 polovično (50%) prekritost plošče in razraščanost 0, da na plošči ni rasti gliv.

Stopnjo rasti na semenih smo zaznali skoraj na vseh vzorcih, vendar smo večino te rasti pripisali kontaminaciji, ki je lahko posledica prisotnosti glivnih spor v laminarijih, kjer smo izvajali poskus, ali nesterilnega dela. Pri delih paradižnika (lupini, o semenju in mesu) smo statistično pomembno rast zaznali le pri vzorcih obdelanih za 30 s, ampak je ta rast prav tako verjetno posledica kontaminacije. Statistično pomembne rasti gliv, ki ni bila posledica kontaminacije, na obdelanih vzorcih nismo zaznali, vendar pa je bilo razraščanje gliv slabo tudi na kontrolnih vzorcih.

To nakazuje, da so bila semena oziroma sadeži že predhodno protiglivno obdelani, zato iz teh rezultatov ne moremo sklepati o učinkovitosti NTP in vpliva različne časovne izpostavljenosti na učinek NTP.

Zaključki

Predvidevamo, da so bila semena oziroma sadeži paradižnika predhodno protiglivno obdelani, zato naših hipotez ne moremo potrditi ali ovreči. Razraščanje gliv, ki smo ga zaznali, je najverjetneje posledica kontaminacije. Poskus bi bilo treba ponoviti s paradižniki, za katere bi vnaprej vedeli, da niso protiglivno obdelani, in s sterilnim delom v sterilnem okolju. Naš poskus bi lahko služil kot smernica v novem ponovljenem poskusu.

Literatura:

- Bourke P, Ziuzina D, Boehm D, Cullen JP, Keener K, 2018. The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production. *Trends in Biotechnology* 36: 615-626
- Dey A, Rasane P, Choudhury A, Singh J, Maisnam D, Rasane P, 2016. Cold Plasma Processing: A review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences: Vol 9 Iss 4*
- Jiang J, Lu Y, Li J, Li L, He X, Shao H, Dong Y, 2014. Effect of Seed Treatment by Cold Plasma on the Resistance of Tomato to *Ralstonia solanacearum* (Bacterial Wilt). *PLoS ONE* 9 (5): e97753

- Kang MH, Pengkit A, Choi K, Jeon SS, Choi HW, Shin DB, Choi EH, Uhm HS, Park G. 2015. Differential Inactivation of Fungal Spores in Water and on Seeds by Ozone and Arc Discharge Plasma. *PLoS ONE* 10 (9): e0139263
- Los A, 2019. How Does Cold Plasma Enhance Seed Germination and Plant Growth? <https://www.technologynetworks.com/applied-sciences/articles/how-does-cold-plasma-enhance-seed-germination-and-plant-growth-325215> (7.1.2020)
- Montie TC, Kelly-Wintenberg K, Roth JR, 2000. An Overview of Research Using the One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma (OAUGDP) for Sterilization of Surfaces and Materials. *IEEE Transactions on Plasma Science* 28 (1): 41-50
- Niemira BA, 2012. Cold Plasma Decontamination of Foods. *Annual Review of Food Science and Technology* 3 (1): 125-142
- Selcuk M, Oksuz L, Basaran P, 2008. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology* 99: 5104-5109
- Surowsky B, Fischer A, Schlueter O, Knorr D, 2013. Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 19: 146-152
- Thirumdas R, Sarangapani C, Annappure US, 2015. Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophysics* 10: 1-11
- Zahoranova A, Henselova M, Hudecova D, Kalinakova B, Kovačik D, Medvecka V, Černak M, 2015. Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on the Wheat Seedlings Vigor and on the Inactivation of Microorganisms on the Seeds Surface. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 36 (2): 397-414

Vpliv nizekoterperturne plazme na privzem vode, viabilnost in kaljivost paradižnika

Petra Drčar, Sara Eržen, Nika Pirnat, Julija Ržišnik in Ajda Vrabič

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Zraziskavo smo želeli ugotoviti ali obdelava semen paradižnika, (*Solanum lycopersicum*) z nizkoterperturno kisikovo plazmo vpliva na viabilnost, kaljivost in privzem vode semen ter na dinamiko rasti korenin.
- V ta namen smo semena paradižnika obdelali z nizkoterperturno plazmo (tlak 50 Pa in delovna moč cca. 1300 W). Parametri so bili ves čas obdelave enaki, le čas izpostavljenosti semen se je razlikoval (0, 5 s, 10 s, 30 s, 60 s). Nato smo z različnimi testi preverjali viabilnost in kaljivost semen, privzem vode v seme ter vpliv na dinamiko rasti korenin.
- Rezultati kažejo negativno povezavo med dolžino izpostavitve hladni plazmi ter viabilnostjo in kaljivostjo. Pri spremljanju dinamike privzema vode in rasti korenin v določenem časovnem obdobju je pri semenih, obdelanih 5 s s hladno plazmo, opazna nekoliko boljša dinamika rasti korenin in privzema vode semen glede na kontrolo.

Ključne besede: *Solanum lycopersicum*, hladna kisikova plazma, viabilnost, kaljivost, privzem vode

Uvod

Po poročanjih Organizacije Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) se bo zaradi podnebnih sprememb, industrializacije in urbanizacije ter z njimi povezanimi procesi potreba po hrani še močneje povečala (Sivachandiran in Khacef, 2017). Svetovna produkcija kmetijstva naj bi se v prihodnjih nekaj letih (v primerjavi z leti 2005 - 2007) povečala za 60% (Zahoranova in sod., 2017). Zagotavljanje novih obdelovalnih površin je že sedaj zelo težavno, zato bo za reševanje tega problema potrebno povečati izkoristek pridelka (Sivachandiran in Khacef, 2017). Poleg tega je okolje, v katerem raste rastline uspevajo danes, izpostavljeno različnim kemikalijam, ki lahko negativno vplivajo na sposobnost kalitve in zgodnje rasti rastlin (Zahoranova in sod., 2017). To je možno preseči s povečanjem kaljivosti semen in rasti rastlin. Glavni razlog nizke kaljivosti je pogosto povezan z okužbo prsti in površine semen z bakterijami in plesnimi (Sivachandiran in Khacef, 2017). Tradicionalni načini za povečevanje izkoristka (gnojenje, namakanje) imajo veliko slabosti, predvsem z ekonomskega in okoljskega vidika (Sivachandiran in Khacef, 2017) (npr. gnojila so vir onesnaževanja, njihova pretirana uporaba vodi v evtrofikacijo vodnih teles (Panda in Behera, 2003)). Težava je tudi v tem, da so semena, ki jih proizvajajo semenarne, pogosto obdelana z insekticidi in fungicidi (Sivachandiran in Khacef, 2017).

Ena izmed novejših metod reševanja tega problema je uporaba nizkotemperaturne oz. hladne plazme, ki lahko stimulira rast rastlin in zmanjša kontaminacijo semen s patogeni oz. kemikalijami (Winter in sod., 2001). Ta metoda je okolju prijazna in se uspešno uporablja za odstranjevanje strupenih in agresivnih kemikalij tudi v medicini in biotehnologiji (Zahoranova in sod., 2017). Uporablja se jo samostojno ali skupaj z drugimi metodami (Winter in sod., 2001). Hladno plazmo je mogoče ustvariti z uporabo radijskih frekvenc ali mikrovalov. Je delno ioniziran plin, v katerem večji, težji delci (ioni, molekule) ostanejo hladni in jih zato lahko uporabljamo za obdelavo občutljivih površin (Ehlbeck in sod., 2011), po drugi strani pa je temperatura elektronov dovolj visoka, da pride do nastajanja reaktivnih kisikovih (ROS) in dušikovih (RNS) zvrsti ter UV sevanja, kar omogoča odstranjevanje okužb, sterilizacijo površin (Laroussi in Leipold, 2004). Uporaba hladne plazme je primerna tudi za obdelavo temperaturno občutljivih bioloških vzorcev, saj jih s to metodo ne poškodujemo (Zahoranova in sod., 2017). Z uporabo hladne plazme se spremeni tudi prepustnost semen za vodo (Wong-Ekkabut in sod., 2007). Prednosti te metode so, da deluje hitro, njena uporaba je ekonomična in ni vir onesnaženja (Ehlbeck in sod., 2011). Študije so pokazale, da obdelava semen s hladno plazmo izboljša kaljivost nekaterih rastlin (Ehlbeck in sod., 2011) (npr. pšenice, rži, oljne repice, fižola... (Jiang in sod., 2014, Zahoranova in sod., 2017)). Njeni vplivi so bolj opazni na koreninah mlade rastline kot na njenem poganjku, saj so le-te bolj razvejane (Magureanu in sod., 2018).

V raziskavi smo semena obdelali s hladno plazmo (3 kV). Čas obdelave je različen za vsako serijo semen (0 s, 5 s, 10 s, 30 s in 60 s). Po obdelavi smo opazovali kakšna je kaljivost semen in njihov privzem vode. Glede na literaturo, kjer so izvajali podobne raziskave, smo pričakovali, da bo imela hladna plazma pri krajših izpostavitvah (5 s in 10 s) ugoden učinek na kaljivost semen, njihov privzem vode, dinamiko rasti korenin in viabilnost semen, glede na kontrolo. Pri daljših izpostavitvah

(30 s in 160 s) smo pričakovali negativne učinke - slabšo kaljivost, privzem vode, dinamiko rasti korenin in viabilnost glede na kontrolo.

Cilj raziskave je bil ugotoviti, kakšna je viabilnost, kaljivost, privzem vode ter dinamika rasti korenin tistih semen, ki smo jih predhodno različno dolgo (0 s, 5 s, 10 s, 30 s in 60 s) obdelovali s hladno plazmo.

Materiali in metode

Uporabljene naprave in materiali:

- Semena paradižnika lokalnega proizvajalca
- Kisikova plazma
- Radiofrekvenčni reaktor ICP (inductively coupled plasma)
- aluminijast pladenj
- vrečke za ločevanje semen
- petrijevke
- filtrirni papir
- voda
- petrijevke
- tetrazolijev klorid
- tehtnica
- komore za kalitev semen
- filtrirni papir

Obdelava semen

Semena paradižnika, *Solanum lycopersicum*, so bila izolirana iz plodov lokalnega proizvajalca, nato pa na Biotehniški fakulteti pripravljena za obdelavo. Razporedili smo jih v vrečke ter jih poslali na Inštitut Jožef Štefan, kjer so jih na aluminijastem pladnju obdelali s hladno plazmo. Uporabljen plin je bil kisik (O₂), pri tlaku 50 Pa in delovni moči cca. 1300 W. Parametri so bili ves čas obdelave enaki, spreminjal se je le čas izpostavitve plazmi (0, 5, 10, 30 in 60 s). Za generacijo plazme so uporabili radiofrekvenčni reaktor ICP.

Priprava vzorcev

Semena, obdelana s hladno plazmo, smo prestavili v petrijevke, kamor smo predhodno nastavili filtrirni papir, ki smo ga namočili z destilirano vodo.

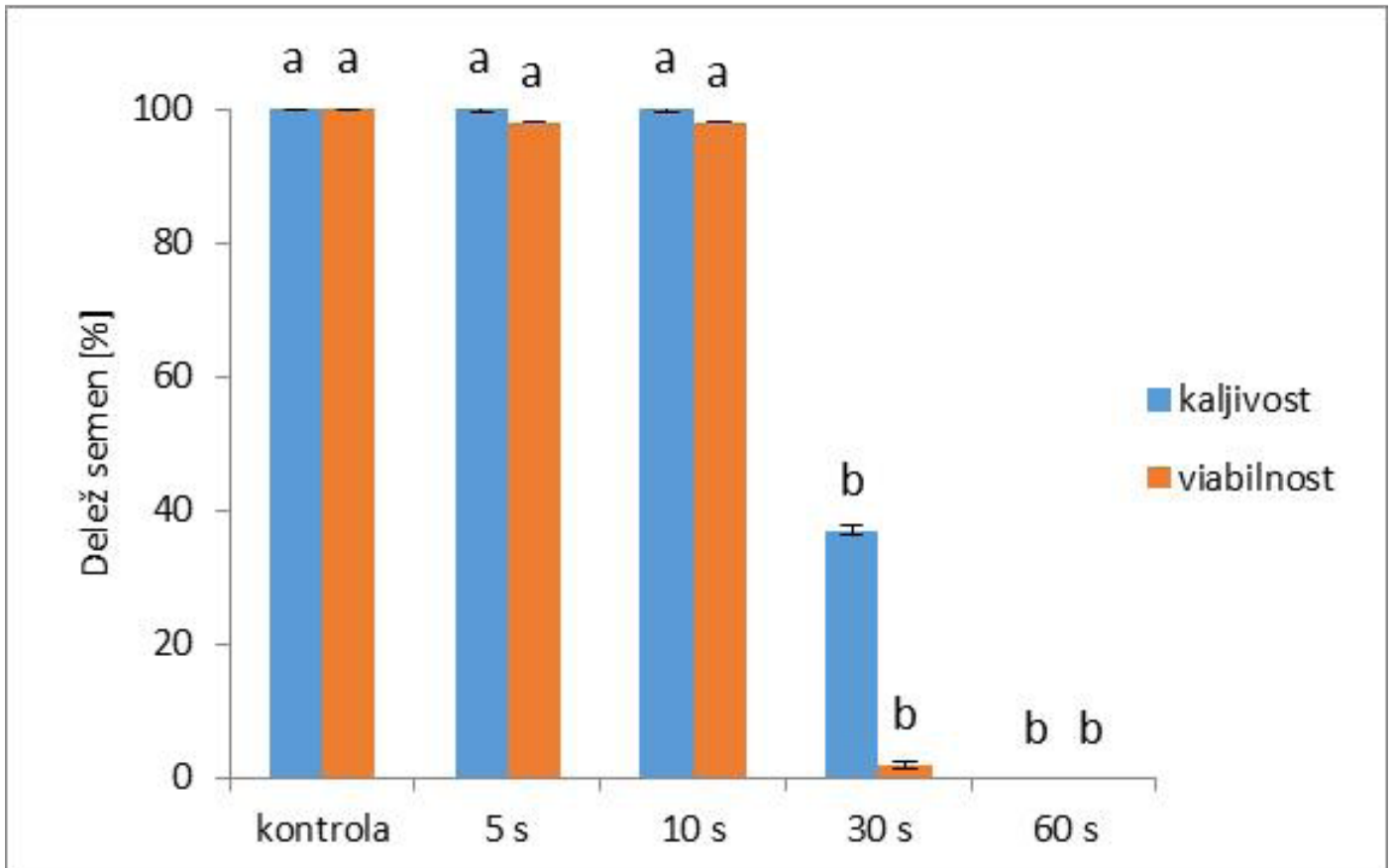
PRIVZEM VODE: Semena smo inkubirali na sobni temperaturi za 24 ur. Pri tem smo prvih 8 ur merili spremembo mase na vsako uro in nato še ob koncu inkubacije (po 24 urah). Privzem vode smo izračunali po spodnji enačbi:

$$WU = (FW - DW) / DW \times 100\%$$

(WU – privzem vode; FW – teža mokrih semen; DW – teža suhih semen) (Zahoranova in sod., 2017).

Test kaljivosti in dinamika rasti korenin

Semena smo postavili v rastne komore in nato izvajali meritve števila kalečih semen in dinamike rasti korenin, 3., 4. in 6. dan od nastavitve poskusa. Opazovali smo tudi razvejanost korenin, tako da smo prešteli število sekundarnih korenin, ki so se odcepile od glavne. Semena smo inkubirali v rastni komori s 16h/8h dnevno/nočno ritmiko pri 23°C/19°C (Jiang in sod., 2017).



Slika 1: Delež viabilnih in kaljivih semen paradižnika pri različno dolgi obdelavi s hladno plazmo 5, 10, 30, 60 sekund. (povprečje ± standardna napaka, N=50). ANOVA in Holm-Šidak Post-hoc test sta pokazala statistično pomembne razlike ($p < 0,05$), ki so na grafu označene z različnimi črkami (a in b).

Test viabilnosti

Semena smo narezali in jih namočili v tetrazolijev klorid ter jih inkubirali 24 ur na sobni temperaturi.

Statistična analiza

Dobljene rezultate s standardnimi napakami smo prikazali na grafih in jih obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA) s Holm-Šidak Post hoc testom (razlike so statistično pomembne pri $p < 0,05$).

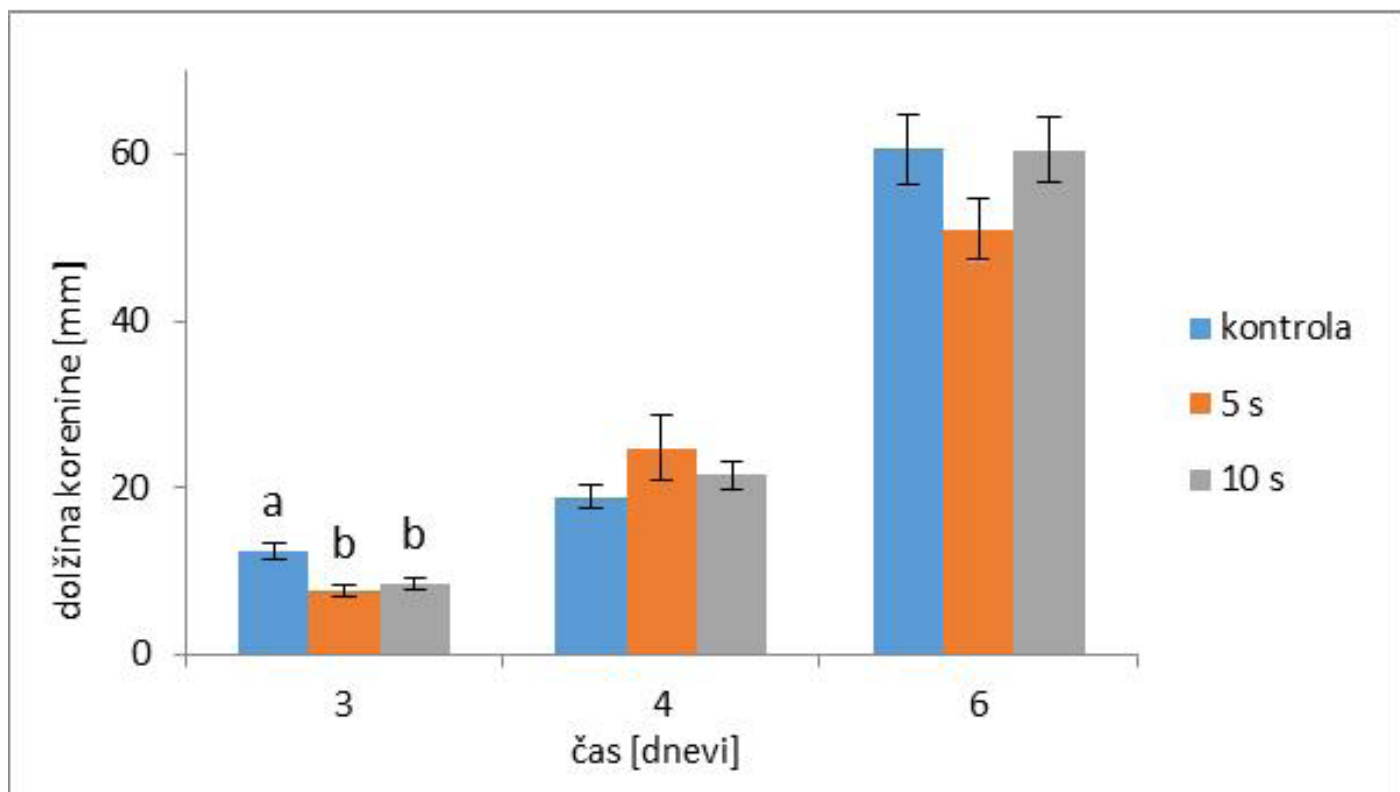
Rezultati

Viabilnost in kaljivost semen se pri 5 in 10 s obdelavi ni razlikovala od kontrole, medtem ko je bila pri 30 in 60 s obdelavi močno zmanjšana (Slika 1). Povprečna dolžina korenin paradižnika je bila 3. dan pri 5 in 10 s obdelavi manjša od kontrole, 4. in 6. dan pa razlike v povprečni dolžini korenin med 5 s in 10 s obdelavo ter kontrolo niso bile statistično pomembne (Slika 2). Pri spremljanju rasti korenin (Graf 2) smo poleg dolžine korenin opazovali tudi pojav sekundarnih korenin. Te se tekom poskusa niso razvile pri nobenem semenu nobenega tretmaja. Največja razlika v privzemu vode se pojavi 2 uri po začetku poskusa. Ta je pri kontroli in 5 s obdelavi višja kot pri ostalih tretmajih. Privzem vode se pri 5 s obdelavi ni statistično pomembno razlikoval od kontrole. Privzem vode pri 10 s obdelavi je bil slabši kot pri kontroli (2. in 24. ura merjenja) ali pa se od kontrole ni statistično razlikoval. Privzem vode pri 30 s je bil slabši kot pri kontroli 2., 3., 8., in 24. ur

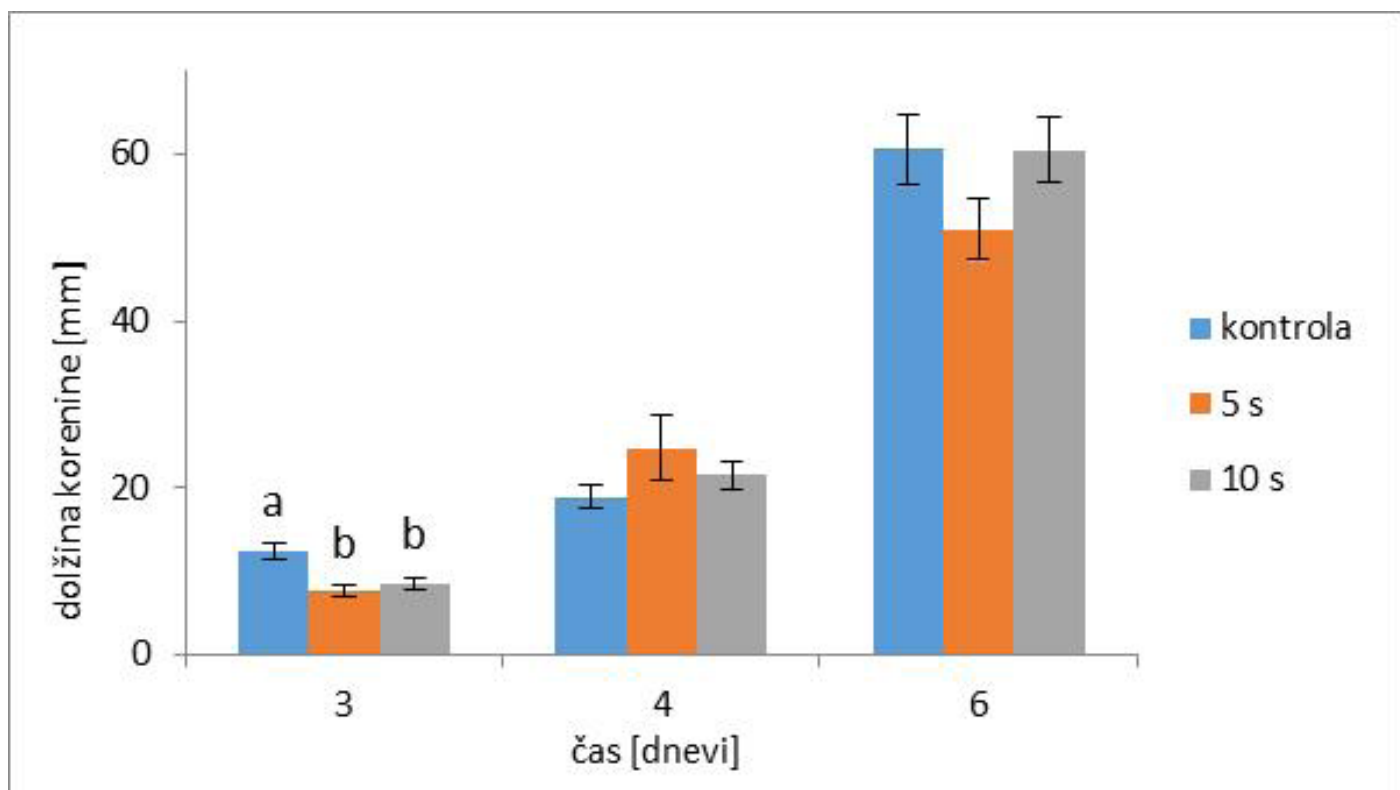
merjenja, medtem ko se pri ostalih urah merjenje od kontrole ni statistično razlikoval. Pri 60 s obdelavi je bil privzem vode slabši kot pri kontroli v vseh časovnih točkah merjenja, razen 1. uro merjenja, ko se od kontrole ni statistično pomembno razlikoval (Slika 3).

Diskusija

Dosedanje študije so pokazale, da ima v nekaterih primerih in pod določenimi pogoji obdelava semen z nizektemperaturno plazmo pozitivne učinke na viabilnost in kaljivost semen ter na privzem vode. Pozitivne učinke na kaljivost so pokazali s kar nekaj študijami. Takšni rezultati so se pojavili pri sojinah semenih, kjer so semena obdelali z nizektemperaturno plazmo, vendar pri različni delovni moči (Ling in sod., 2014), kar je med drugim tudi dokaz, da pomemben parameter ni samo dolžina obdelave s plazmo, ampak tudi delovna moč. Tudi pri semenih bombaža se je pojavila izboljšana kaljivost po 27 minutni obdelavi semen (de Groot in sod., 2018) in pa pri semenih redkvice, paradižnika in paprike, kjer so semena obdelali z vodo, ki so jo predhodno obdelali z nizektemperaturno plazmo (Sivachandrian in sod., 2017). Obdelava s hladno plazmo verjetno vpliva na voske ter vrhne sloje semena, posredno pa tudi na celice zarodka in s tem izboljša kaljivost semen (Sivachandrian in sod., 2017). Tako kot velja za kaljivost pa tudi za viabilnost dosedanje raziskave kažejo podobne pozitivne učinke. V večini primerov se je viabilnost po obdelavi semen z nizektemperaturno plazmo, izboljšala. Rezultati kaljivosti in viabilnosti, ki smo jih dobili



Slika 2: Dolžina korenin paradižnika pri različno dolgi obdelavi s hladno plazmo pri 5 in 10 sekundah. (povprečje ± standardna napaka, N=50). ANOVA in Holm-Šidak Post-hoc test sta pokazala statistično pomembne razlike ($p < 0,05$), ki so na grafu označene z različnimi črkami (a in b).



Slika 3: Privzem vode semen paradižnika pri različno dolgi obdelavi s hladno plazmo pri 5, 10, 30, 60 sekundah. (povprečje ± standardna napaka, N=5). ANOVA in Holm-Šidak Post-hoc test sta pokazala statistično pomembne razlike ($p < 0,05$), ki so na grafu označene z različnimi črkami (a, b in c).

z našo raziskavo, ne sledijo rezultatom dosedanjih raziskav, ker na grafu ni vidnega trenda izboljšanja nobenega izmed

parametrov (Slika 1). Ravno nasprotno - učinki plazme se niso izkazali samo kot pozitivni, ampak tudi kot negativni.

Negativni rezultati se niso pojavili samo pri naši raziskavi. Predolga obdelava semen z nizekotemperaturno plazmo je vplivala negativno na dolžino korenin semen paprike, paradižnika in redkvice (Sivachandrian in sod., 2017). Nekaj raziskav je prav tako pokazalo, da obdelava s plazmo spodbuja rast korenin. Tako so ugotovili, da je obdelava z nizekotemperaturno plazmo izboljšal rast korenin pri pšenici (Jiang in sod., 2013). Rast korenin je izboljšala tudi obdelava s plazmo pod atmosferskim pritiskom (Zhou, 2011). Poleg dolžine korenin nas je zanimal tudi privzem vode, ki sledi trendu prejšnjih parametrov in se je v različnih raziskavah izkazal za izboljšane z obdelavo z nizekotemperaturno plazmo. To je dokazal tudi Ling s sodelavci, katerega raziskave so pokazale, da je privzem vode zaradi obdelave s plazmo boljši. Tako kaljivost kot privzem vode, ki smo ju spremljali v naši raziskavi, nista pokazali statistično pomembne spremembe oz. pozitivnega trenda, s katerim bi lahko potrdili, da sta se parametra zaradi obdelave s plazmo izboljšala (Graf 2, 3 in 4). Razmeroma velika nihanja pri privzemu vode (Graf 3) lahko deloma pripišemo tudi napakam pri merjenju, saj so semena majhna in relativno lahka. Vsekakor je mogoče, da hladna plazma na semena vpliva pozitivno, vendar je iz literature razvidno, da je potrebno tretma prilagoditi posamezni vrsti semena.

Zaključki

V raziskavi smo pričakovali, da bo imela hladna plazma pri krajših izpostavitvah (5 in 10s) ugoden učinek na kaljivost semen in privzem vode. Na podlagi naših rezultatov to hipotezo ovržemo, saj obdelava ni imela pozitivnega učinka na kaljivost in viabilnost v primerjavi s kontrolo. Pri daljših izpostavitvah (30 in 60 s) smo pričakovali slabšo viabilnost, kaljivost in privzem vode, kar smo z rezultati potrdili. Statistično pomembne razlike v rasti korenin so se pokazale samo v prvem dnevu, kjer smo ugotovili, da sta 5 s in 10 s obdelava s hladno plazmo negativno vplivali na rast korenin.

Literatura

- Ehlbeck J., Schnabel U., Polak M., Winter J., von Woedtke T., Brandenburg R., von dem Hagen T., Weltmann KD. 2011. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44, 1: 013002
- Jiang JF., He X., Li L., Li JG., Shao HL., Xu QL., Ye HR., Dong YH. 2014. Effect of cold plasma treatment on seed germination and growth of wheat. *Plasma Science and Technology*, 16, 1: 54–58
- Jiang JF., Li JG., Dong, YH. 2018. Effect of cold plasma treatment on seedling growth and nutrient absorption of tomato. *Plasma Science and Technology*, 20, 4: 044007
- Laroussi M., Leipold F. 2004. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 233, 1-3: 81-86
- Magureanu M., Sirbu R., Dobrin D., Gidea M. 2018. Stimulation of the germination and early growth of tomato seeds by non-thermal plasma. *Springer science + business media*.
- Panda RK., Behera S. 2003. Non-point source pollution of water resources: Problems and perspectives. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 1, 3-4: 308-311
- Sivachandiran L., Khacef A. 2017. Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. *RSC Advances*, 7, 4: 1822-1832
- Winter, T., Winter, J., Polak, M., Kusch, K., Mäder, U., Sietmann, R., Ehlbeck, J., van Hijum, S., Weltmann, K.D., Hecker, M., Kusch, H. 2001. Characterization of the global impact of low temperature gas plasma on vegetative microorganisms. *Proteomics*, 11, 17: 3518-3530
- Wong-Ekkabut J., Xu ZT., Triampo W., Tang IM., Tieleman DP., Monticelli L. 2007. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophysical Journal*, 93, 12: 4225-4236
- Zahoranova A., Hoppanova L., Šimončicova J., Tučekova Z., Medvecka V., Hudecova D., Kalinakova B., Kovačik D., Černak M. 2017. Effect of cold atmospheric pressure plasma on maize seeds: Enhancement of seedlings growth and surface microorganisms inactivation. *Springer science + business media*.
- Zhou, Zhuwen. (2011). Introduction of a new atmospheric pressure plasma device and application on tomato seeds. *Agricultural Sciences*. 02. 23-27. 10.4236/as.2011.21004.

Vpliv sode bikarbone na rast fižola

Lara Beden, Angela Doneva, Živa Kolenc, Eva Lavrenčič, Tamara Petrushevijk

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- želeli smo ugotoviti vpliv sode bikarbone na rast fižola (*Phaesolus vulgaris*). Spremljali smo rast fižola in izmerili dolžine poganjkov in korenin, število stranskih korenin ter število listov.
- rastline smo posadili v lončke in ga po razvoju navadnih listov zalivali z različnimi raztopinami sode bikarbone. Po 12 dneh smo izmerili dolžino poganjkov in korenin ter število listov in stranskih korenin.
- fižol je najslabše rasel pri rastlini, ki smo jo zalivali z 1,5 % koncentracijo sode bikarbone, najboljše pa pri kontroli, čeprav razlike med izpostavitvami niso bile statistično značilne v vseh primerih. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da ima soda bikarbona negativen vpliv na rast rastline. Rastline, ki smo jih zalivali z 1,5 % koncentracijo NaHCO_3 so propadle.
- v našem eksperimentu smo pokazali, da zalivanje fižola z raztopino sode pri višjih koncentracijah povzroči propad rastline.

Ključne besede: *Phaesolus vulgaris*, natrijev bikarbonat, abiotski stres

Uvod

Natrijev hidrogenkarbonat oziroma natrijev bikarbonat, znan tudi kot soda bikarbona, je sol natrija in hidrogenkarbonata s kemijsko formulo NaHCO_3 . Je pomembna komercialna kemikalija, ki se uporablja kot sestavina v pecilnem prašku, pijačah, gasilnih sredstvih, čistilih ter v medicinski in veterinarski farmaceutiki. Raztopino natrijevega hidrogenkarbonata se lahko uporablja kot fungicid, vendar zalivanje z raztopino soli poviša koncentracijo natrija v tleh, kar vodi v zasoljevanje tal (Brown and Wadleigh). Čeprav spada med kemikalije s statusom GRAS, ima lahko negativne učinke na okolje. V vodi natrijev bikarbonat razpade na natrijeve in bikarbonatne ione. 1 % vodna raztopina ima rahlo alkalen pH med 8 in 8,6 (Kim et al. 2019).

Natrijeva alkalnost je prisotna širom sveta in je bolj škodljiva za rast rastlin kot slanost. Pri natrijevi alkalnosti prisotnosti NaHCO_3 povzroči visok pH, velik presežek prostih Na^+ ionov, majhno zmožnost vodne infiltracije in visoko raven bikarbonata. Bikarbonat, ki obkroža korenine, zniža dostopnost nekaterih mikronutrientov, še posebej Fe, in je pogosto primarni faktor kloroze rastlin v pogojih natrijeve alkalnosti (Liu and Saneoka 2019). V C3 rastlinah, med katere spada tudi fižol (*Phaseolus vulgaris*, dvokaličnica in pomembna kmetijska rastlina), natrij v normalnih količinah stimulira rast s podaljševanjem celic, delno pa lahko zamenja kalij kot osmotsko aktiven ion. Natrij v rastlinske korenine preide z difuzijo prek gradienta elektro-kemijskega potenciala, iz citosola pa se črpa aktivno v vakuolo ali medcelični prostor. Prenos natrija v liste dodatno zmanjša transpiracijo prek ksilema. V odgovor na osmotski stres lahko rastline spreminjajo svoj osmotski potencial (Taiz in Zeiger 1998). Visoka koncentracija soli ali natrija v zemlji rastlini preprečuje absorpcijo vode, kar vodi do stresa zaradi suše. Najbolj ranljiva so semena v fazi kalitve in mlade rastline, ki jih lahko visoke koncentracije soli ali natrija ubijejo. Pri starejših rastlinah natrij ovira rast korenin, zaustavi cvetenje in zmanjša pridelek pri vrtnih rastlinah (Kim in sod. 2019)

Naš namen je bil ugotavljanje vpliva na rast fižola (*Phaseolus vulgaris*) pri zalivanju z različnimi koncentracijami vodne raztopine sode bikarbone. Na podlagi prejšnjih raziskav, izvedenih na drugih rastlinskih vrstah, smo predvidevali, da bo fižol ob zalivanju z NaHCO_3 kazal znake abiotičnega stresa (suše), poganjki in korenine bodo krajši, število stranskih korenin in listov pa bo manjše. Ob višjih koncentracijah bo rastlina propadla.

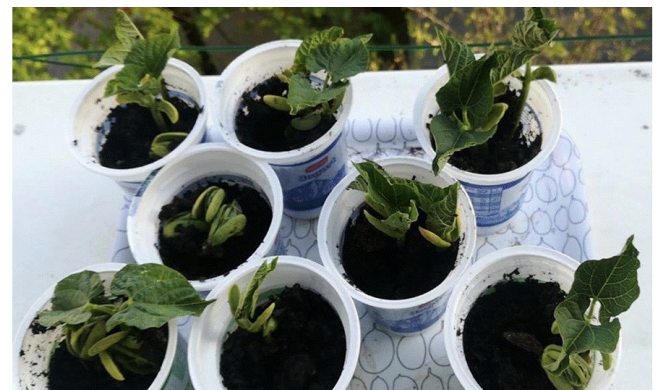
Material in metode

Za izvedbo poskusa smo posadili fižol (*Phaseolus vulgaris*) v 8 lončkov in ga do razvoja prvih pravih listov zalivali z navadno vodo iz pipe (Slika 1 in 2). Izmerili smo dolžino poganjkov. Nato smo fižol zalivali z dvema žlicama navadne vode (kontrola) oziroma z žlico navadne vode in žlico raztopine sode bikarbone v koncentracijah 0,5 %, 1 % in 1,5 % w/w. Po 12 dneh smo fižol izkopal iz zemlje in z ravnilom izmerili dolžino korenin in poganjkov ter prešteli stranske korenine in liste.

Za primerjavo povprečij po izpostavitvah smo izvedli analizo variance (ANOVA) v programu R. Da bi upoštevali vpliv dejavnikov, ki so vplivali na rast na različnih lokacijah, smo lokacijo pri analizi upoštevali kot slučajni dejavnik. V primeru statistično značilnega rezultata smo uporabili Tukeyev test



Slika 1: Posaditev fižola v 8 lončkov.



Slika 2: Fižol pred zalivanjem z raztopino sode bikarbone.

hkratnih primerjav za primerjavo povprečij med izpostavitvami. V kolikor je bilo smiselno, smo analizirali trend (naklon) z linearno regresijo ter tako preverili, ali obstaja statistično značilen linearen trend vpliva koncentracije na rast ob upoštevanju lokacije.

Rezultati

Po 10 dneh zalivanja z raztopino sode bikarbone so rastline, zalivane s koncentracijo 1,5 % propadle, rast je bila manjša tudi pri ostalih koncentracijah NaHCO_3 (Slika 3 do 10). Pri izpostavitvi fižola natrijevemu bikarbonatu smo opazili statistično pomembne razlike med izpostavitvami pri dolžini poganjka ($F(3,30)=4,87$, $p<0,01$) (Slika 11) in številu stranskih korenin ($F(3,30)=4,82$, $p<0,01$) (Slika 12). Dolžina poganjkov je bila pri izpostavitvi koncentraciji natrijevega bikarbonata 1 % oziroma 1,5 % v povprečju manjša od dolžine poganjkov pri kontroli. Povprečne dolžine poganjkov znotraj obravnavanj so se med lokacijami zaradi različnih pogojev rasti precej razlikovale, zato smo lokacijo upoštevali kot slučajni faktor pri statistični analizi in tako z lokacijo pojasnili del variabilnosti meritev. Trend zmanjševanja dolžine poganjka v odvisnosti od koncentracije je približno linearen: če se je ob upoštevanju lokacije koncentracija povečala za 1 %, se je dolžina glavne korenine v povprečju zmanjšala za 1,1 cm. Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik med povprečji števila listov ($F(3,30)=2,87$, $p=0,053$) (Slika 14). Na dveh lokacijah nismo opazili zmanjševanja povprečnega števila listov na rastlino pri višjih koncentracijah raztopine, na eni izmed lokacij pa so imele rastline, izpostavljene višjim koncentracijam sode bikarbone v povprečju manj listov (Slika 14). Rastline, ki smo jih zalivali z 1,5 % koncentracijo sode bikarbone,



Slika 3: Ponovitev 1, iz zemlje izkopan fižol po 12h dneh (K1, K2, 0,5% - 1 in 2).



Slika 4: Ponovitev 1, iz zemlje izkopan fižol po 12h dneh (1%-3 in 4, 1,5%- 5 in 6)



Slika 5: Ponovitev 2, iz zemlje izkopan fižol po 12h dneh (K1, K2, 0,5%- 1 in 2).



Slika 6: Ponovitev 2, iz zemlje izkopan fižol po 12h dneh (1%-3 in 5, 1,5%- 4 in 6).



Slika 7: Ponovitev 3, iz zemlje izkopan fižol po 12 dneh (0,5 %).



Slika 8: Ponovitev 3, iz zemlje izkopan fižol po 12 dneh (1 %).

so po 12 dneh ovenele in propadle. Ovenelo je tudi nekaj rastlin pri koncentraciji 1 %.

Diskusija

Vpliv zalivanja z NaHCO_3 je odvisen od koncentracije NaHCO_3 . V našem poskusu smo statistično značilne zmanjšanje rasti poganjka v primerjavi s kontrolo zaznali pri 1,0 % in 1,5 % koncentracijah NaHCO_3 . Tudi pri dolžini glavne korenine, številu stranskih korenin in številu listov smo na našem vzorcu opazili upad rasti glede na kontrolo, vendar razlike zaradi relativno velike variabilnost meritev znotraj izpostavitve niso

bile statistično značilne.

Opazili smo tudi da je vpliv NaHCO_3 poleg same koncentracije raztopine odvisen tudi od skupne dodane količine v posameznem obravnavanju. V lonček, ki smo ga zalivali z 0,5 % koncentracijo raztopine, smo v dvanajstih dneh dodali približno 0,9 g, pri koncentraciji 1 % 1,8 g in pri koncentraciji 1,5 % približno 2,7 g NaHCO_3 .

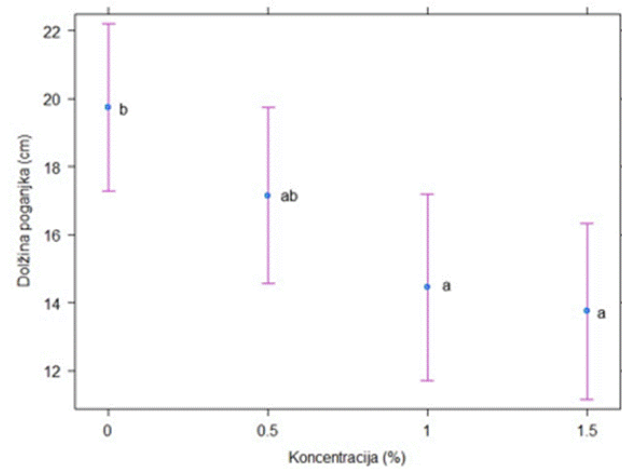
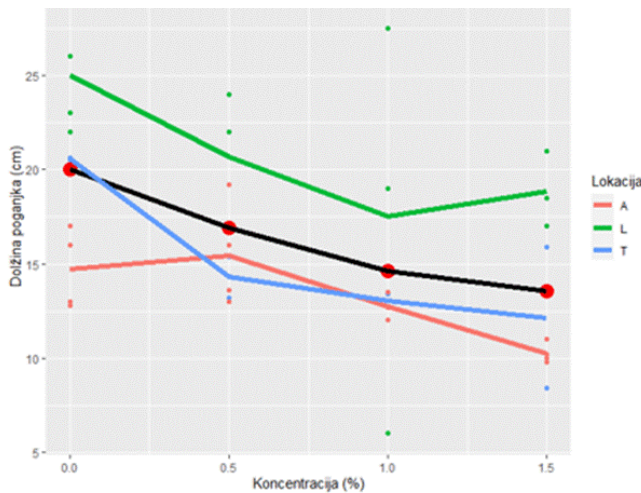
Alkalne soli, med katere spada tudi natrijev bikarbonat, imajo večji destruktiven efekt kakor nevtralne soli (NaCl), a kljub temu obstaja le nekaj raziskav, v katerih se preučuje odpornost rastlin na alkalne razmere. Reaktivne kisikove snovi (ROS), ki se naberejo v celici med stresom s soljo, lahko poškodujejo



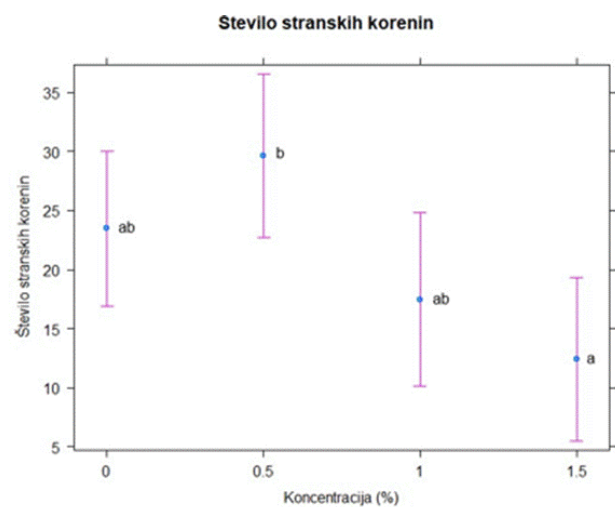
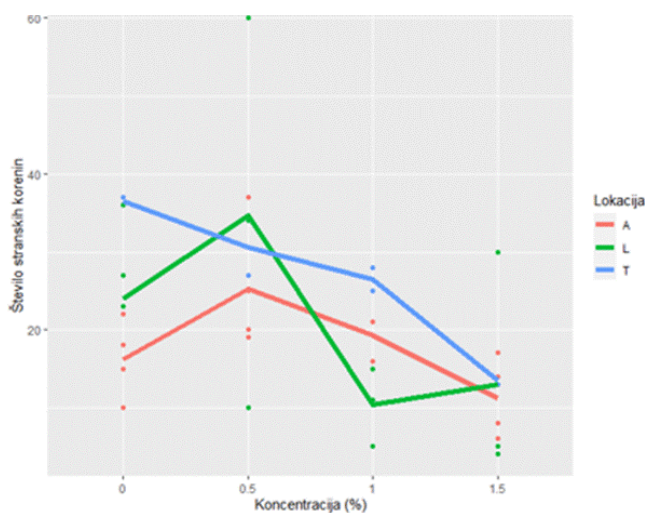
Slika 9: Porumenitev listov fižola pri koncentraciji 1,5%.



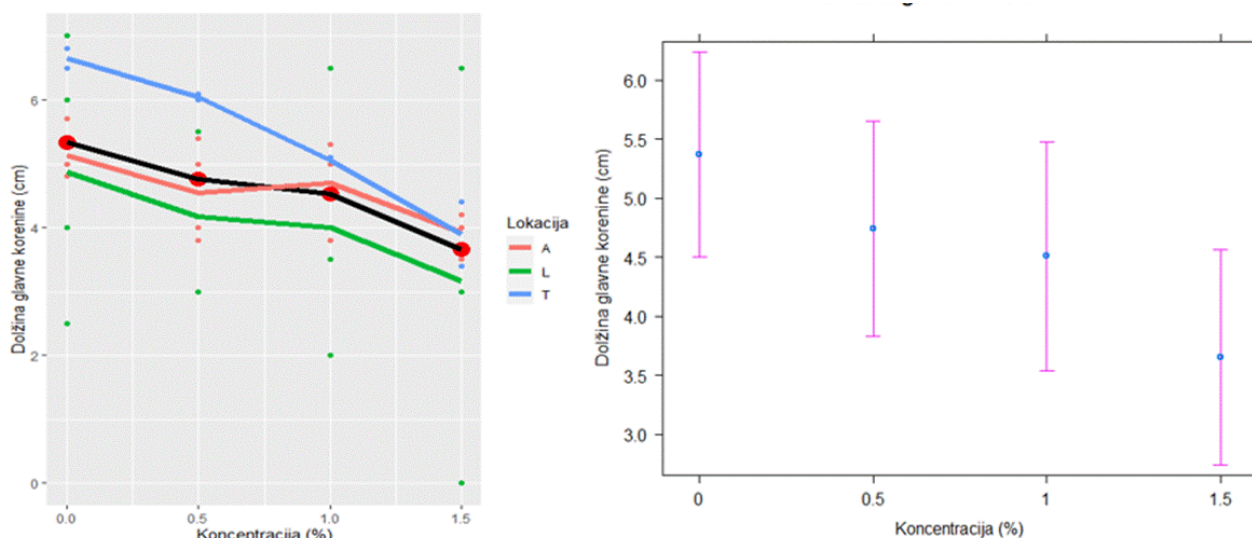
Slika 10: Propad fižola pri koncentraciji 1,5%.



Slika 11: Meritve dolžin poganjka v odvisnosti od koncentracije. Zelena, modra in rdeča črta povezujejo povprečja po lokacijah, črna črta pa skupna povprečja (levo). Povprečna dolžina poganjka glede na koncentracijo NaHCO_3 s 95 % intervalom zaupanja za povprečno napoved (desno). Različne črke ob povprečnih vrednostih pomenijo statistično značilne razlike ($p < 0,05$).



Slika 12: Število stranskih korenin v odvisnosti od koncentracije (levo). Povprečno število stranskih korenin glede na koncentracijo NaHCO_3 s 95 % intervalom zaupanja za povprečno napoved (desno). Različne črke ob povprečnih vrednostih pomenijo statistično značilne razlike ($p < 0,05$).



Slika 13: Meritve dolžine korenine v odvisnosti od koncentracije (levo). Povprečna dolžina glavne korenine glede na koncentracijo NaHCO_3 s 95 % intervalom zaupanja za povprečno napoved (desno). Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

in uničijo rastlinsko celico, če jih rastlina prej ne odstrani. Natrijev bikarbonat inhibira superoksidno dismutazo (SOD) in peroksidazo (POD), kar vodi do uničenja rastlinskih celic (Sun in Luo 2014). Nabiranje ROS je torej lahko eden izmed razlogov za manjše število listov, manjše število stranskih korenin in krajše glavne korenine glede na kontrolo.

Najbolj izrazito se je rast zmanjšala v poganjkih fižola, kar sovпада z nekaterimi raziskavami, ki so pokazale, da stres, ki ga povzroča NaHCO_3 , zmanjša aktivnost PSII in PSI in ekspresijo njihovih proteinskih kompleksov ter bistveno zniža količino proteinov, vključenih v elektronsko prenašalno verigo (Huihui in sod. 2020a; Hui-hui in sod. 2019). Raziskava na vrsti *Morus alba* L. je pokazala, da abiotični stres, ki ga povzroči NaHCO_3 , bistveno zmanjša fotosintezno aktivnost in respiracijo, obenem pa poveča količino ROS, kot sta O_2^- in H_2O_2 . Aktivnost in ekspresija katalaze se zmanjšata, obenem pa se poveča aktivnost POD, da razgradi H_2O_2 , toda inhibira se razgradnja O_2^- s SOD. Ekspresija elektronskih donorjev feredoksin tioredoksin reduktaze se je zmanjšala in onemogočila dodatno uničevanje H_2O_2 (Huihui in sod. 2020b).

Zaključki

Na podlagi našega poskusa lahko trdimo, da zalivanje z 1,0 % in 1,5 % raztopino sode bikarbone negativno vpliva na rast rastline, predvsem na dolžino poganjkov in število stranskih korenin. Poskus bi bilo smiselno ponoviti na večjem vzorcu in v bolj kontroliranem okolju.

Literatura

1. Brown JW, Wadleigh CH Influence of Sodium Bicarbonate on the Growth and Chlorosis of Garden Beets. Bot. Gaz. 116:201–209
2. Hui-hui Z, Guang-liang S, Jie-yu S, et al (2019) Photochemistry and proteomics of mulberry (*Morus alba* L.) seedlings under NaCl and NaHCO_3 stress. Ecotoxicol Environ Saf 184.
3. Huihui Z, Xin L, Yupeng G, et al (2020a) Physiological and proteomic responses of reactive oxygen species metabolism and antioxidant machinery in mulberry (*Morus alba* L.) seedling leaves to NaCl and NaHCO_3 stress. Ecotoxicol Environ Saf 193.
4. Huihui Z, Yue W, Xin L, et al (2020b) Chlorophyll synthesis and the

photoprotective mechanism in leaves of mulberry (*Morus alba* L.) seedlings under NaCl and NaHCO_3 stress revealed by TMT-based proteomics analyses. Ecotoxicol Environ Saf 190:.

5. Kim S, Chen J, Cheng T, et al (2019) PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. Nucleic Acids Res 47:D1102–D1109.
6. Liu L, Saneoka H (2019) Effects of NaHCO_3 acclimation on rye (*Secale cereale*) growth under sodic-alkaline stress. Plants 8.
7. Sun YD, Luo WR (2014) Effects of exogenous hydrogen sulphide on seed germination and seedling growth of cucumber (*Cucumis sativus*) under sodium bicarbonate stress. Seed Sci Technol 42:126–131.
8. Taiz L, Zeiger E (1998) Plant physiology, Second edition. U.S.A. Sinauer Associates, Inc.

Vpliv nizkotemperaturne plazme na kaljivost in združbo gliv semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*)

Alen Fuks, Marija Jovcevska, Vanja Kolar, Matjaž Kordiš, Kristina Matijašič

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Z raziskavo smo želeli ugotoviti, kako nizkotemperaturna kisikova plazma vpliva na kaljivost semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) ter na rast in diverzitetu gliv.
- Semena smo izpostavili nizkotemperaturni kisikovi plazmi za različna časovna obdobja in nato določili kaljivost le-teh ter ocenili rast in diverzitetu gliv.
- Ugotovili smo, da se je z daljšimi izpostavitvami semen tatarske ajde kisikovi plazmi, slabšala kaljivost semen ter zmanjševala razrast gliv.

Ključne besede: *Fagopyrum tataricum*, nizkotemperaturna plazma

Uvod

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum*) je rastlina, ki tradicionalno raste predvsem v goratih predelih Kitajske in Himalaje. Zrna ajde vsebujejo veliko proteinov, maščob, vitaminov, mineralov ter flavonoidov in so kot taka idealna za človeško prehrano in zato ajda ponovno pridobiva na priljubljenosti. Odporna je na nizke temperature ter sušo. Tatarska ajda v visokogorju proizvaja precejšnjo količino antioksidativnih snovi, ki ščitijo njena tkiva pred UV žarki, pri ljudeh pa je zaznan blagodejen vpliv na ožilje. (Zhou in sod., 2018).

Zaradi vse večje obremenitve okolja s fitofarmaceutskimi sredstvi je v interesu številnih raziskovalcev razviti alternativne metode, ki bi zavirale rast patogenih gliv po setvi, a hkrati ne bi bile zaviralec kalitve, ki je ključna za komercialno koriščenje semen. Nova obetavna metoda je uporaba nizkotemperaturne (hladne) plazme. To je mešanica atomov, vzbujenih molekul in nabitih delcev, ki je na področju medicine že uporabljena za sterilizacijo medicinske opreme in površinsko dekontaminacijo mikrobnih patogenov kot so bakterije, glive in virusi (Sakudo in sod., 2019; Bafoil in sod., 2019). Na področju kmetijstva in v prehranski industriji so o koristnih učinkih hladne plazme poročali številni avtorji, kjer bi hladno plazmo lahko uporabili za dekontaminacijo hrane, embalaže in orodja kot tudi za sterilizacijo v kmetijstvu - semen, gnojil, vode in tal. Ling in sod. (2014), so preučevali učinke hladne plazme na kalitev semen in nadaljnji razvoj sadik soje, v odvisnosti od moči plazme, s katero so obdelovali semena (0, 60, 80, 120 W hladne plazme, 15 sekundne izpostavitve). Potrdili so pozitiven vpliv hladne plazme. Najboljši učinek na kalitev, rast sadike in spremembo permeabilnosti semenske ovojnice so določili pri 80 W moči obdelave s hladno plazmo.

Najpogostejši rodovi gliv, ki so jih našli pri tatarski ajdi, so *Pseudocercospora*, *Alternaria*, *Neonectria* in *Phomopsis* (Zhong in sod., 2017). Glive lahko povzročijo poškodbo celične membrane ter iztekanje celičnih vsebin iz semen, kar zmanjša kaljivost semen, ki so skladiščena (Halloin, 1983). Ugotovili so, da na interakcije med glivo in rastlino vplivajo različni dejavniki (abiotski, biotski) in pri simbiozi imajo pomembno vlogo primarni in sekundarni metaboliti gliv in rastlin. Recimo flavonoidi imajo pomembno vlogo kot signalne verige, ko gre za interakcijo med arbuskularno mikorizno glivo ter gostiteljem, saj delujejo antibakterijsko in tako zaščitijo rastline ajde, ko le-te kalijo (Zhou in sod., 2011). Regvar in sod. (2012) so ugotovili, da UV sevanje povzroča porast v koncentraciji flavonoidov, kar je smiselno, saj tatarsko ajdo sejejo na višjih nadmorskih višinah, kjer je tudi več UV sevanja. Zhou in sod. (2018) so odkrili tudi, da encimski inhibitorji, ki ščitijo pred proteolitičnimi encimi žuželk in patogenih mikrobov, v semenih ne delujejo proti lastnim proteazam, medtem ko so proti tujim proteolitičnim encimom učinkoviti. Sicer velja ajda za odporno rastlino, a jo vseeno lahko okuži 30 različnih gliv, in sicer vse od semena do žetve. Pri semenih v prsti lahko glive povzročijo trohnobo stebel in korenin ter odmiranje kalic (Milevoj, 1989). Naša hipoteza je bila, da hladna kisikova plazma negativno vpliva na kaljivost semen ter rast gliv in daljši kot je čas izpostavitve, slabša je kaljivost semen in rast gliv.

Metode

Obdelava semen s plazmo

V našem poskusu nas je zanimalo, ali hladna plazma vpliva na kaljivost semen tatarske ajde in kakšen je njen vpliv na rast in diverzitetu gliv. Semena tatarske ajde so na Inštitutu Jožefa Stefana obdelali z nizkotemperaturno kisikovo plazmo, s frekvenco (f) 27.12 MHz, močjo (P) ~ 8 kW ter tlakom 50 Pa. pri tem je bil uporabljen radiofrekvenčni (induktivno sklopljen) napajalnik, na katerega je bila vezana 2 m dolga plazemska cev (I). Semena so hladni plazmi izpostavljali različni čas, torej 0s, 30s, 60s, 90s, 120s, 150s in 180s.

Kalitveni test

Za izvedbo kalitvenega testa, smo pripravili petrijevke s filtrirnim papirjem, ki smo ga dobro navlažili z destilirano vodo. V vsako petrijevko smo dali po 20 semen, in za vsako izpostavitvijo naredili 5 paralelek. Tako pripravljene petrijevke smo dali v temo in postavili v rastno komoro (temperatura 26°C, RH okoli 70%). Vsak dan smo nato spremljali kalitev semen.

Izolacija gliv iz semen (kultivacija)

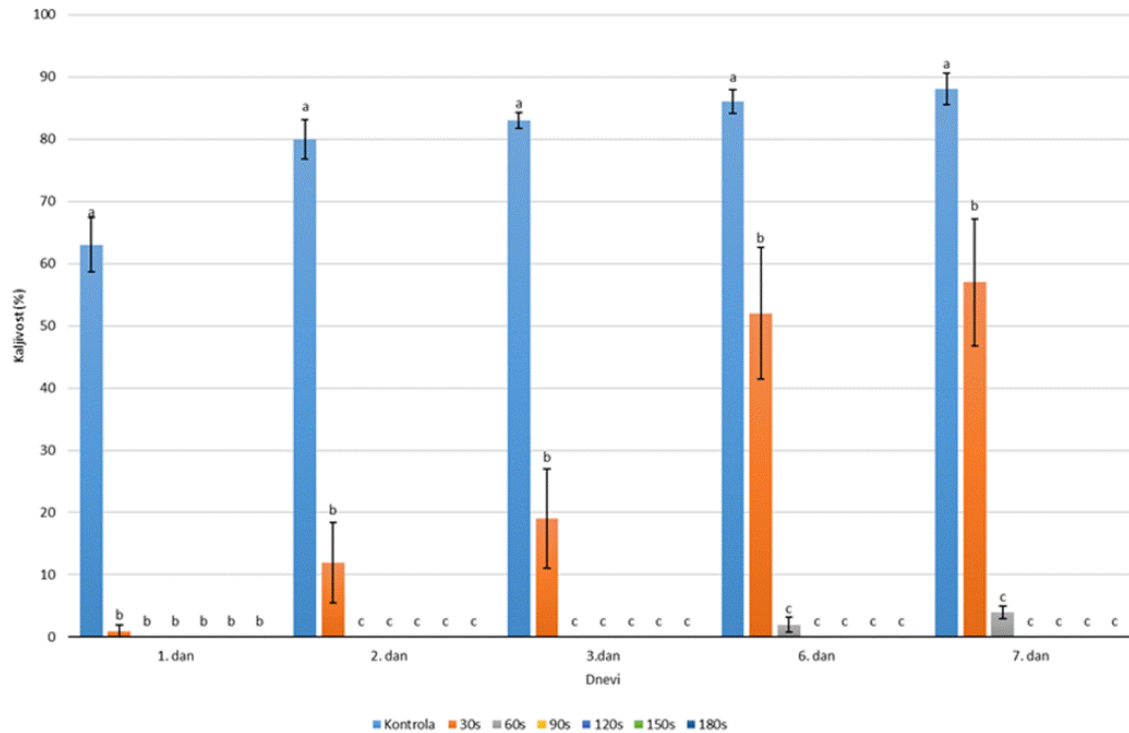
Za kultivacijo gliv smo uporabili petrijevke s PDA gojiščem. V brezprašni komori smo iz vrečke obdelanih semen za vsako izpostavitve vzeli po pet semen in jih položili na petrijevke z gojiščem. Ker smo za vsako izpostavitve izolirali glive iz površine in iz notranjosti semen, smo po pet semen prerezali na pol in jih ravno tako dali na sredino petrijevke. Na koncu poskusa smo ocenili število morfotipov gliv in stopnjo rasti.

Statistična obdelava

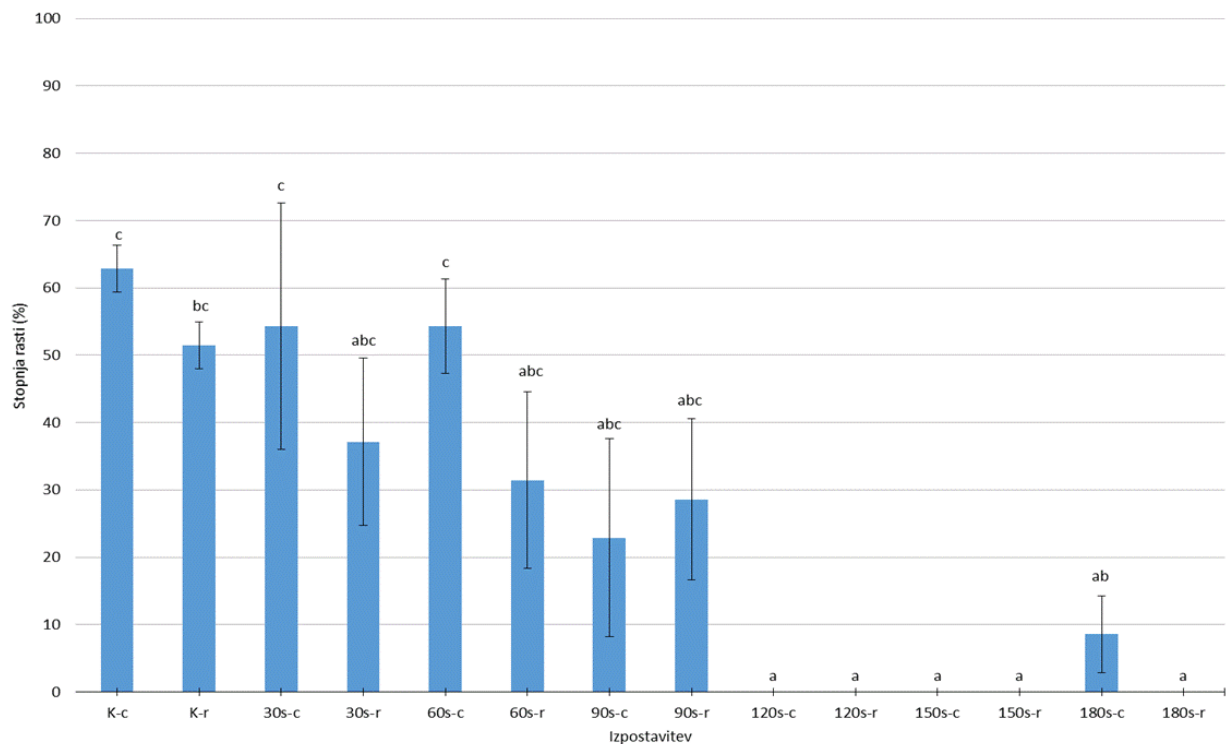
Podatke smo zbrali v programu Microsoft Excel in jih statistično obdelali v programu R-commander z uporabo Tukey Post Hoc testa ($p < 0,05$).

Rezultati

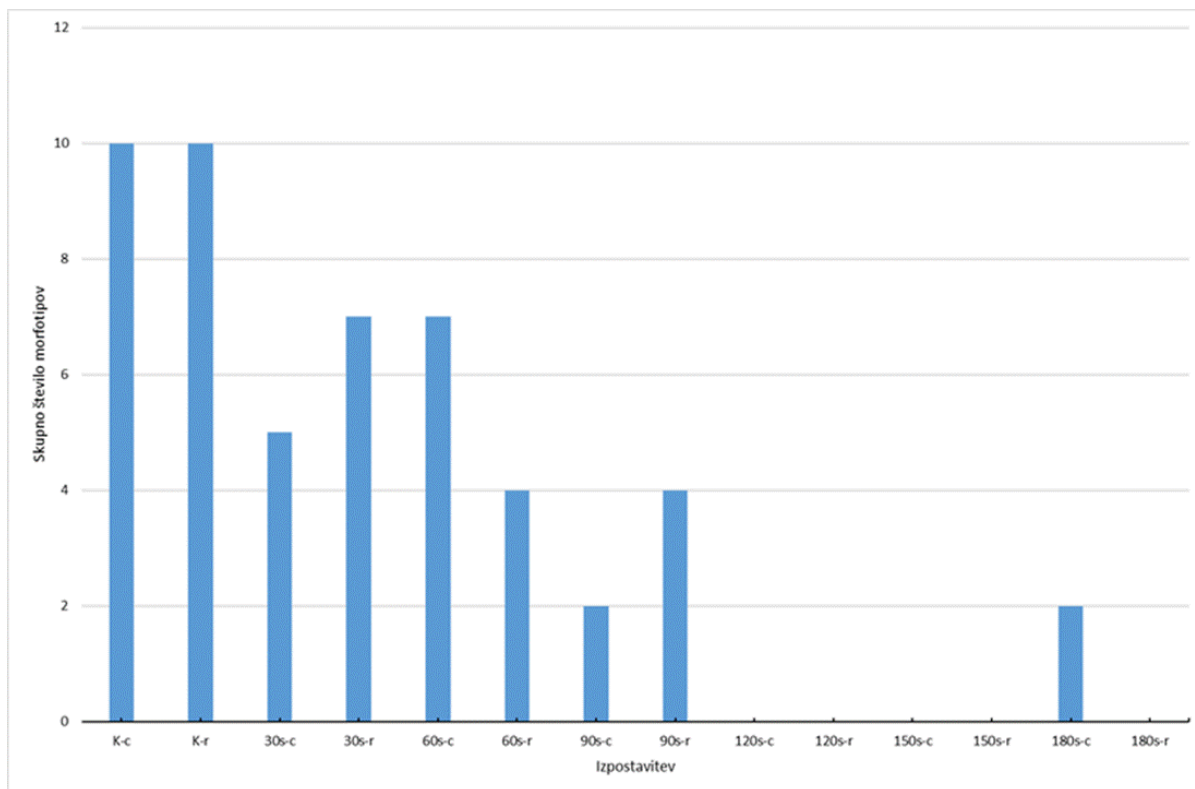
Kalitev semen tatarske ajde smo spremljali 1., 2., 3., 6. in 7. dan. Statistična obdelava (ANOVA) je pokazala, da je izpostavljanje semen hladni plazmi statistično značilno vplivala na kaljivost semen. Iz slike 1 je razvidno, da so kalila le semena kontrolne skupine in izpostavljena 30 sekund. Povprečje kontrolne skupine pri vseh vzorčenjih se je statistično značilno razlikovalo od povprečij izpostavljenih skupin. Prvi dan med povprečji izpostavitve ni bilo statistično značilnih razlik. Statistično značilne razlike med povprečji izpostavitve so se pokazale od drugega dneva dalje in sicer le med vzorci, izpostavljenimi 30 sekund in vsemi ostalimi vzorci. Po enem tednu smo ocenili rast in morfologijo gliv. Slika 2 prikazuje stopnjo rasti gliv. Pri izpostavitvah, višjih od vključno 120 sekund ni prišlo do razrasta gliv. Gliva pri 180 sekundah je verjetno posledica kontaminacije, saj je zrasla stran od semena. Med celimi in rezanimi semeni ni statistično značilnih razlik v stopnji rasti gliv. Tako pri glivah s površine, kot tudi z notranjosti semen ni statistično značilnih razlik med stopnjo rasti kontrolne skupine in skupinami, ki so bile izpostavljene plazmi do vključno 90 sekund. Skupine, ki so bile plazmi izpostavljene 120 sekund in več, se statistično razlikujejo od



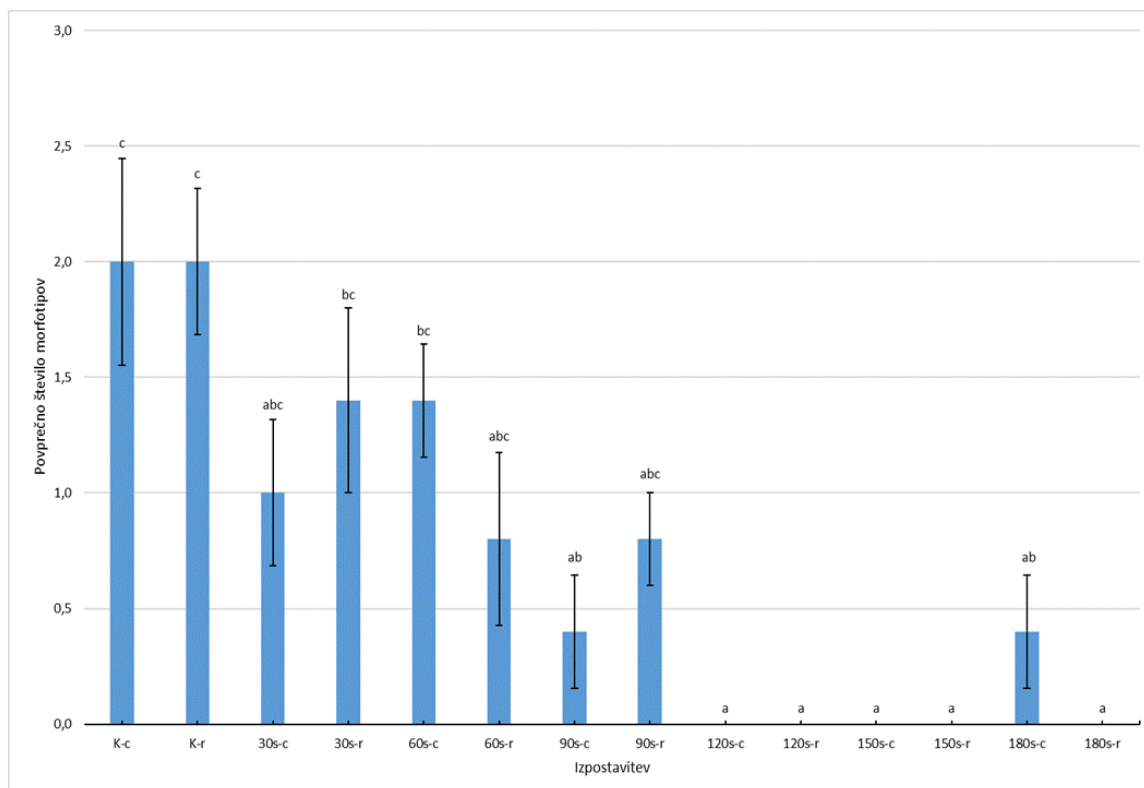
Slika 1: Kaljivost semen (%) tatarske ajde, obdelanih s plazmo ($SV \pm SE$, $n=100$). Različne črke označujejo statistično značilno razliko med izpostavitvami na posamezni dan, ugotovljeno s Tukey testom pri $p < 0,05$. Podatkov med posameznimi dnevi nismo primerjali.



Slika 2: Stopnja rasti gliv (%) s površine (oznaka "c") in iz notranjosti (oznaka "r") semen tatarske ajde, obdelanih s plazmo ($SV \pm SE$, $n=5$). Glive, zrastle pri izpostavitvi 180 sekund, so verjetno posledica kontaminacije. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med vzorci, ugotovljeno s Tukey testom pri $p < 0,05$.



Slika 3: Skupno število glivnih morfotipov s površine in iz notranjosti semen tatarske ajde, obdelanih s plazmo. Glive, zrastle pri izpostavitvi 180 sekund, so verjetno posledica kontaminacije.



Slika 4: Število glivnih morfotipov s površine in iz notranjosti semen tatarske ajde, obdelanih s plazmo ($SV \pm SE$, $n=5$). Glive, zrastle pri izpostavitvi 180 sekund, so verjetno posledica kontaminacije. Različne črke označujejo statistično značilno razliko med vzorci, ugotovljeno s Tukey testom pri $p < 0,05$.

kontrolnih skupin. Med skupinami, izpostavljenimi 120 sekund in več ni statistično značilnih razlik (Slika 2).

Povprečno število morfortipov vseh izpostavitvev skupaj se med celimi in rezanimi semeni ni razlikovalo. Iz slike 3 je razvidno, da je število vseh glivnih morfortipov pri vseh izpostavitvah manjše kot pri kontrolni skupini. Slika 4 prikazuje povprečno število glivnih morfortipov s površine in iz notranjosti semen. Povprečno število morfortipov gliv iste izpostavitve s površine in iz notranjosti semen se med seboj ne razlikuje statistično značilno. Pri glivah s površine semen ni statistično značilnih razlik med povprečno stopnjo rasti kontrolne skupine in skupinami, ki so bile izpostavljene plazmi, do vključno 60 sekund. Skupine, ki so bile izpostavljene plazmi 90 sekund in dlje, se statistično razlikujejo od kontrolnega vzorca, med seboj pa se statistično ne razlikujejo. Pri glivah iz notranjosti semen ni opaziti statistično značilne razlike med kontrolno skupino in izpostavitvami do vključno 90 sekund, daljše izpostavitve pa se od kontrole statistično razlikujejo. Izpostavitve, višje od 90 sekund se med seboj statistično ne razlikujejo.

Diskusija

Ena izmed potencialno uporabnih metod za zaviranje rasti gliv na/v semenih tatarske ajde je uporaba nizkotemperaturne kisikove plazme, ki poleg zaviranja rasti gliv lahko vpliva na kalitev semen. Številni znanstveniki so že preverjali vpliv hladne plazme na kalitev semen. Šera B. in sod. (2012) so pokazali, da lahko različne metode s katerih obdelamo semena s hladno plazmo pomembno vplivajo na to ali bodo vplivi na rast in razvoj pozitivni ali negativni. To potrjujejo tudi poskusi na soji in pšenici, kjer so potrdili pozitivne učinke na kaljivost in kasnejšo rast ter donos pri poljskih poskusih (Jiafeng L. in sod 2014; Ling L. in sod., 2020). Rezultati našega poskusa so pokazali, da izpostavitve plazmi povzročijo zmanjšano kaljivost semen tatarske ajde. Odstotek kalitve je odvisen od časa izpostavitve, pri čemer so kalila le semena, izpostavljena plazmi 30 in 60 sekund. 30 sekundna izpostavitve ne vpliva na čas začetka kalitve, medtem ko pri 60 sekundni izpostavitvi pride do zakasnjene kaljivosti. Rezultati raziskav kažejo, da obdelava s plazmo povzroči zmanjšanje naravno prisotnih mikroorganizmov, ki se nahajajo na površini semen (Sulcuk in sod. 2008; Mitra in sod. 2014). V našem poskusu smo preverjali razrast in število morfortipov gliv, a ker nismo naredili nadaljnjih analiz, ne vemo, katere glive so endofitske in katere sopovršinske kontaminante. Tako do zmanjšanja stopnje rasti, kot tudi števila glivnih morfortipov je prišlo šele, ko smo semena plazmi izpostavili za vsaj 120 sekund. Izjema, ki je nastala pri 90 sekundni izpostavitvi je verjetno le rezultat eksperimentalne napake oz premalo ponovitev poskusa. Pričakovali bi povezavo med stopnjo rasti gliv in kaljivostjo (večja kot je stopnja rasti gliv, nižja je kaljivost), a glede na rezultate tega ne moremo potrditi. Opazimo, da je pri navečji stopnji rasti gliv tudi največja kaljivost.

Glede na rezultate, bi bilo le za prehranske namene smiselno uporabiti vsaj 120 sekundno izpostavitve, saj tam pride do zavrte rasti gliv. Ker pa že pri izpostavitvah višjih od 60 sekund semena ne kalijo, taka obdelava ne bi bila primerna za nadaljnjo kultivacijo semen. Če pa bi želeli semena tudi kultivirati, bi mogli poiskati kompromis med kaljivostjo in razrastjo gliv. Smiselno bi bilo narediti dodaten poskus, kjer bi bila semena izpostavljena hladni plazmi v podrobnejših časovnih intervalih med 30 in 60 sekundami. Tako bi dobili

čas izpostavljenosti, ki bi dal boljše razmerje med kaljivostjo in rastjo gliv. Poskus bi bilo smotno ponoviti, preizkusiti drugačne metode obsevanja z hladno plazmo, ter glivne izolate sekvencirati in identificirati.

Zaključki

V narejenem poskusu smo potrdili hipotezo, da hladna kisikova plazma negativno vpliva na kaljivost semen ter rast gliv in daljši kot je čas izpostavitve, slabša je kaljivost semen in rast gliv. Na podlagi rezultatov ne moremo trditi, ali so prisotne glive površinske kontaminante ali endofitske glive, je pa raziskava dobra iztočnica za nadaljnje poskuse na tem področju.

Literatura

- Bafoil, M., Le Ru, A., Merbahi, N., Eichwald O., Dunand C., Yousfi M. 2019. New Insights of Low-Temperature Plasma Effects on Germination of Three Genotypes of *Arabidopsis Thaliana* Seeds Under Osmotic and Saline Stresses. *Scientific Reports* 9: 8649.
- Halloin J.M. 1983. Deterioration resistance mechanisms in seeds. *Phytopathology*, 73, 2: 335–339
- Jiafeng J., Xin H., Ling L., Jiangang L., Hanliang S., Qilai X., Renhong Y., Yuanhuan D. 2014. Effect of Cold Plasma Treatment on Seed Germination and Growth of Wheat. *Plasma Science and Technology* 16, 1: 54–58
- Ling, L., Jiafeng, J., Jiangang, L., Minchong S., Xin H., Hanliang S., Yuanhua D. 2015. Učinki obdelave hladne plazme na kalitev semena in rast sadike soje. *Scientific Reports* 4: 5859.
- Milevoj L. 1989. Buckwheat diseases. *Fagopyrum*, 9: 31–40
- Mitra, A., Li, Y., Klämpfl, T.G., Shimizu T., Jeon J., Morfill G. E., Zimmermann J. L. .2014. Inactivation of Surface-Borne Microorganisms and Increased Germination of Seed Specimen by Cold Atmospheric Plasma. *Food Bioprocess Technology* 7: 645–653.
- Regvar M., Bukovnik U., Likar M., Kreft I. 2012. UV-B radiation affects flavonoids and fungal colonisation in *Fagopyrum esculentum* and *F. tataricum*. *Central European Journal of Biology*, 7, 2: 275–283.
- Sakudo, A Yagyu, Y .; Onodera, T. 2019. Disinfection and Sterilization Using Plasma Technology: Fundamentals and Future Perspectives for Biological Applications. *International Journal of . Molecular Sciences*, 20, 20: 5216.
- Selcuk, M., Oksuz, L., & Basaran, P. (2008). Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology*, 99, 11: 5104–5109.
- Šera, B., Gajdova, I., Černak, M., Gavril, B., Hnatiuc, E., Kovačik, D., Kriha V., Slama J., Šeri M., Špatenka, P. 2012. How various plasma sources may affect seed germination and growth. 13th International Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment (OPTIM).
- Zhong L. Y., Liang Z., Xiao H. T., Wen F. L., Gang Z., Jiang L. Z. 2017. Community of endophytic fungi from the medicinal and edible plant *Fagopyrum tataricum* and their antimicrobial activity. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16, 2: 387–396.
- Zhou X., Cheng S., Yang Y., Zhou Y., Tang W., Zhang X., Wang Q., Li Z. 2011. Toward a novel understanding of buckwheat self-defensive strategies during seed germination and preliminary investigation on the potential pharmacological application of its malting products. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 32: 6946–6954
- Zhou M., Tang Y., Deng X., Ruan C., Ding M., Shao J., Tang Y., Wu Y. 2018. Buckwheat germplasm in the world. *Elsevier*: 45–52.

Vpliv nizkotemperaturne plazme na združbo gliv semen ajde

Fišer Sara, Klobučar Nika, Pavšič Ana, Vodnik Luka, Vršnik Julijan

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Skladiščena semena so pogosto slabe kakovosti zaradi glivnih in bakterijskih okužb. Spore gliv na površini semen zatirajo z uporabo različnih fungicidov, ki pa škodujejo okolju in posledično tudi organizmom. Preizkušajo se nove okolju prijazne metode sterilizacije, med katerimi je tudi sterilizacija z nizkotemperaturno plazmo.
- V raziskavi smo spremljali učinke sterilizacije semen ajde z nizkotemperaturno plazmo. Preverjali smo vpliv različne časovne izpostavljenosti plazmi ter njen učinek na razvoj gliv tako na površini kot v notranjosti semena. Zanimala nas je diverziteta gliv in njihova razrast.
- Rezultati kažejo, da rast in diverziteta gliv upadeta s podaljševanjem izpostavljenosti semen nizkotemperaturni plazmi, zaradi česar se ta metoda površinske sterilizacije zdi obetavna, zlasti za semena namenjena za krmo in prehrano. Za uspešnost metode pri sterilizaciji semen, ki se uporabljajo za sejanje, pa je ključnega pomena tudi ohranjanje viabilnosti semen.

Ključne besede: Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*), nizkotemperaturna plazma, sterilizacija, semena, diverziteta, glive

Uvod

Skладиščenje semen je v kmetijstvu še vedno velik izziv. Viabilnost semen ogrožajo bakterijske in glivne okužbe. Omejujemo jih z uporabo kemičnih sredstev, ki pa predstavljajo ekološko tveganje. Kot alternativa se raziskuje sterilizacija z nizkotemperaturno plazmo (Zahoranová idr., 2018). Nizkotemperaturna plazma je delno ioniziran plin, ki poleg ionov in elektronov vsebuje tudi reaktivne zvrsti npr. kisikove in dušikove radikale (Sivachandiran in Khacef, 2017). Sterilizacija semen z nizkotemperaturno plazmo deluje preko nespecifičnega cepjenja kovalentnih vezi na površini semen (Basaran idr., 2008).

V raziskavi smo ugotavljali učinke sterilizacije z nizkotemperaturno plazmo na glivno združbo semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*). Semena smo najprej izpostavili različnim pogojem sterilizacije, nato pa smo jih prenesli na gojišča ter opazovali razrast gliv in število morfotipov gliv. Postavili smo tri hipoteze:

1. Daljša kot bo izpostavitvev nizkotemperaturni plazmi, manjša bo razrast gliv in število morfotipov.
2. Sterilizacija bo manj vplivala na prerezana semena.
3. Pri najdaljši izpostavitvi bodo glive še vedo prisotne.

Materiali in metode

Obdelava semen na Institutu Jožefa Stefana (IJS)

Uporabljen plin je bil kisik (O₂), pri tlaku 50 Pa in delovni moči okrog 1300 W. Parametri so bili ves čas enaki, spreminjal se je le čas izpostavitve plazmi (0, 30, 60, 90 in 120 sekund). Za generacijo plazme se je uporabil RF (radio frequency) reaktor ICP (inductively coupled plasma). Vzorce smo položili na aluminijast pladenj. S plazmo smo obdelali skupno 150 semen oz. 30 semen za posamičen tretma (0, 30, 60, 90 in 120 sekund).

Priprava gojišča

V steklenico s širokim vratom smo zatehtali 15 g gojišča PDA in 35 mg antibiotika kloramfenikola. Do oznake 700 ml smo dolili destilirano vodo, premešali in avtoklavirali. Gojišče smo nalili v označene plastične petrijevke (približno do polovice) in pustili da se ohladi.

Prenos semen na ploščo

Skupno smo za posamičen tretma (npr. 30 sekund) uporabili 16 plošč. Na prvih 8 plošč smo dali po eno celo seme, na drugih 8 plošč pa po eno polovico razrezanega semena (drugo polovico razrezanega semena smo zavrgli). Plošče smo nato ovili s folijo za živila in jih inkubirali v rastni komori pri temperaturi okrog 23°C.

Spremljanje rasti gliv (7 dni)

Plošče smo vsak delovni dan ob približno isti uri natančno pregledali in jih slikali. Opažanja rasti smo zabeležili s številkami od 0 do 7:

- 0 = rasti ni oz. je ni mogoče določiti (0 % površine plošče)
- 1 = rast je vidna s prostim očesom, a nedoločljiva iz slike (= < 1,7 % površine)
- 2 = rast je vidna s prostim očesom in delno določljiva tudi iz

slike (= > 1,7 % površine)

3 = rast je izrazita tudi iz slike (= > 2,7 % površine)

4 = obsežna rast (= > 17 % površine)

5 = zelo obsežna rast (= > 44 % površine)

6 = več kot 60 % površine

7 = več kot 90 % površine

Izolacija gliv

Plošče smo razporedili po pultu in združili tiste, na katerih so rastle na videz enake glive. Za izolacijo smo izbrali od 1 do 3 plošče z glivami istega morfotipa (označili smo jih z enako črko). Z lanceto smo izrezali približno 0,5 cm x 0,5 cm velik košček gojišča s posamezno glivo (ob robu, kjer je bila gliva najmlajša) in jo prenesli na novo ploščo. Označene plošče smo nato ovili s folijo za živila in jih inkubirali v rastni komori pri temperaturi okrog 23°C.

Izolacija DNK iz gliv

Izoliranim glivam smo s pomočjo protokola »GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit« izolirali DNK. Po verižni reakciji s polimerazo (PCR) smo produkte poslali v tujino, kjer bodo s sekvenciranjem identificirali vrste naših gliv (rezultati bodo znani po objavi članka).

Statistična obdelava podatkov

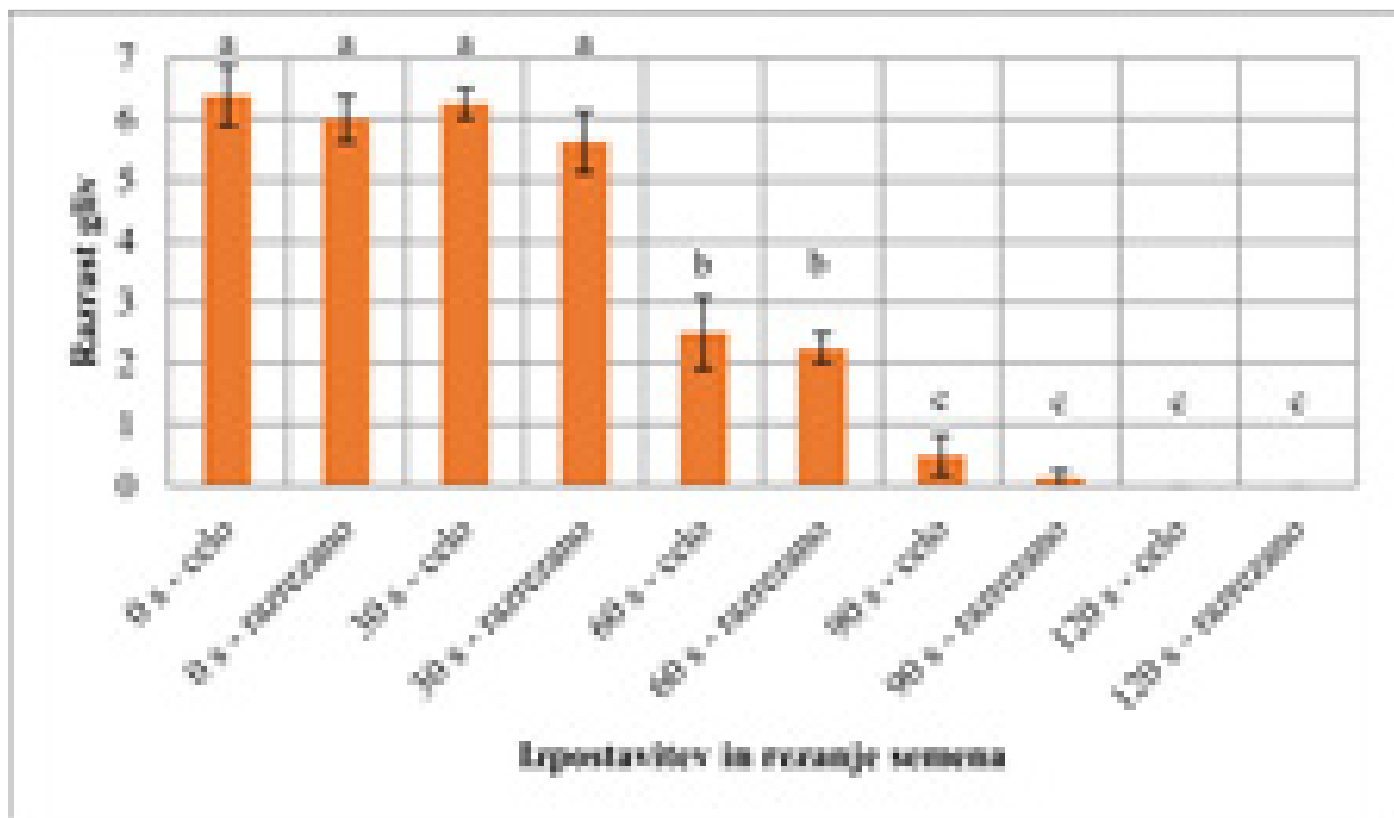
Rezultate smo obdelali s statističnim testom ANOVA. Tako smo preverili, ali so podatki statistično značilno pomembni ali ne. Glede na standardno napako je statistična analiza na Grafu 1 podatke združila v tri statistično značilne skupine (a, b, c). Števila od 1 do 7 na Grafu 1 se nanašajo na range omenjene v točki »Materiali in metode« oz. »Spremljanje rasti gliv (7 dni)«. Glede na standardno napako je statistična analiza na Grafu 2 podatke združila v pet statistično značilnih skupin (a, ab, bc, c, d).

Rezultati

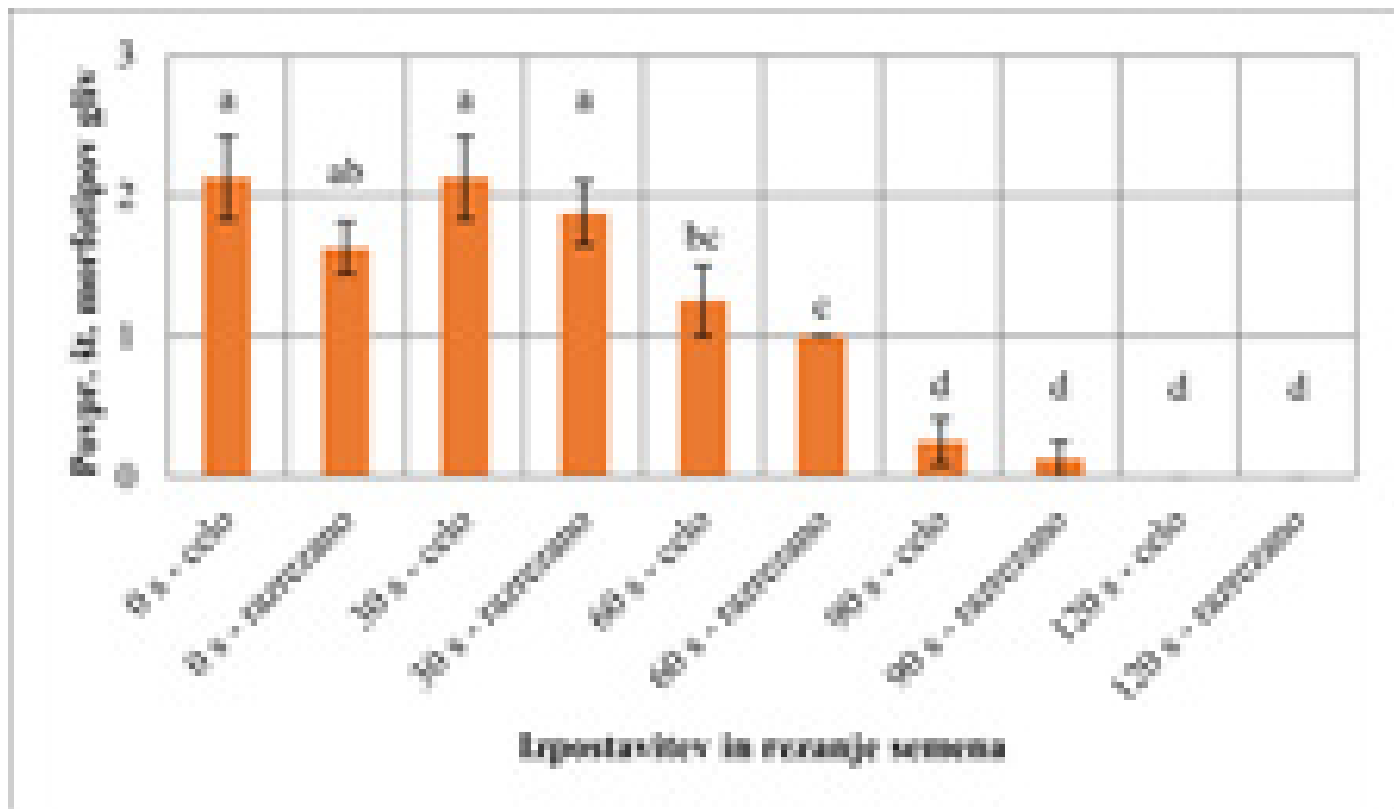
Slike razrasti gliv in njihovih morfotipov so prikazane v prilogah. Slika 1 prikazuje primerjavo razrasti gliv ob različnih izpostavitvah med 1. in 8. dnem inkubacije, pri čimer je za vsako izpostavitvev prikazano posamezno gojišče. Slika 2 prikazuje posamezne morfotipe gliv, kot smo jih uspeli makroskopsko določiti.

Rezultati kažejo, da se z daljšanjem izpostavitvev nizkotemperaturni plazmi razrast gliv manjša (Slika 1). Značilne razlike v glivni razrasti so opazne po 60-sekundni izpostavitvi plazmi, ter nadalje po 90-sekundni izpostavitvi plazmi. Po 120-sekundni izpostavitvi ni opaziti nikakršne razrasti gliv, s čimer lahko glede na naš vzorec govorimo o 100 % sterilizaciji, ta izpostavitvev je letalna za vse glive, ki so sposobne rasti na uporabljenem gojišču. Med kontrolo in 30-sekundno izpostavitvijo pa ni statistično značilnih razlik.

Z daljšanjem izpostavitvev nizkotemperaturni plazmi se manjša diverziteteta gliv, ocenjena preko povprečnega števila morfotipov gliv (Slika 2). Podobno kot pri razrasti so značilne razlike v povprečnem številu morfotipov opazne zlasti po 60-sekundni izpostavitvi plazmi ter po 90-sekundni izpostavitvi plazmi. Opaznejše so razlike v povprečnem številu morfotipov gliv med rezanimi in celimi semeni pri enakih izpostavitvah.



Slika 1: Razrast gliv glede na izpostavitve (0 s, 30 s, 60 s, 90 s in 120 s) in rezanje semena (celo in razrezano). Števila od 1 do 7 na Grafu 1 se nanašajo na range omenjene v točki »Materiali in metode« oz. »Spremljanje rasti gliv (7 dni)«.



Slika 2: Povprečno število morfolipov gliv glede na izpostavitve (0 s, 30 s, 60 s, 90 s in 120 s) in rezanje semena (celo in razrezano). Števila od 1 do 7 na Grafu 1 se nanašajo na range omenjene v točki »Materiali in metode« oz. »Spremljanje rasti gliv (7 dni)«.

Diskusija

Če primerjamo cela in razrezana semena posamezne izpostavitve, vidimo, da za razrast gliv in za število morfortipov gliv ni statističnih razlik med semeni. Sterilizacija deluje le površinsko, kar spovpada z rezultati Basaran in sod (2008).

Nižjo razrast gliv z razrezanih semen lahko pojasnimo, da so se, s tem ko smo obdelano seme prerezali, začele razraščati endofitske glive, ki rastejo počasneje od gliv na površini semena (Kovačec in sod, 2016).

Rezultati razrasti in diverziteti potrjujejo našo prvo hipotezo: daljša kot je izpostavitve nizkotemperaturni plazmi, manjši sta razrast in povprečno število morfortipov.

Rezultati razrasti in diverziteti so ovrgli našo drugo hipotezo: sterilizacija nima manjšega vpliva na razrezana semena.

Sterilizacija ima podoben vpliv na razrast pri rezanih in celih semenih, pri razrezanih semenih pa je manjša diverziteteta.

Rezultati razrasti so ovrgli našo tretjo hipotezo: pri najdaljši izpostavitvi (120 s) ni več prisotnih gliv.

Sterilizacija je potekla hitro in učinkovito, saj smo popolno devitalizacijo dosegli že pri 120 sekundni izpostavitvi. Rezultat je posledica višje moči plazme (1300 W) kot v podobnih raziskavah (400 W Zahoranová in sod., 2018, 300 W Basaran in sod., 2008), ter verjetnosti lažnih negativnih rezultatov pri naši metodi merjenja – razrast smo lahko spremljali samo za tiste glive, ki so bile sposobne rasti na našem gojišču (PDA + kloramfenikol). Razliko med našimi rezultati in rezultati v literaturi (Zahoranová in sod., 2018) lahko pojasnimo tudi kot posledico razlik med glivnimi združbami na semenih koroze in ajde.

Zaključki

Obdelava semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) z nizkotemperaturno plazmo zmanjša razrast gliv in število morfortipov gliv. Glede na naše rezultate in rezultate skupine, ki je preverjala viabilnost semen, lahko trdimo, da sterilizacija semen z nizkotemperaturno plazmo ni najboljši način za skladiščenje semen v kmetijstvu. Morda bi z uporabo nizkotemperaturne plazme nižje moči lahko dosegli boljši kompromis med sterilizacijo in vplivom na viabilnost semen. Vsekakor pa lahko takšna semena uporabljamo v prehrani (npr. ajdova kaša), saj med obdelavo ne pride do uničenja hranilnih snovi v semenu.

Literatura

1. Basaran, P., Basaran Akgul, N. in Oksuz L. (2008). Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. *Food Microbiology*, 25(4), 626-632. doi: 10.1016/j.fm.2007.12.005
2. Sivachandiran, L. in Khacef, A. (2017). Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. *The Royal Society of Chemistry*, 7(4), 1822-1832. doi: 10.1039/c6ra24762h
3. Zahoranová, A., Hoppanová, L., Šimončicová, J., Tučeková, Z., Medvecká, V., Hudecová, D., Kaliňáková, B., Kováčik, D. in Černák, M. (2018). Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Maize Seeds: Enhancement of Seedlings Growth and Surface Microorganisms Inactivation. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 38, 969-988. doi: 10.1007/s11090-018-9913-3
4. Kovačec E, Likar M. in Regvar M. (2016) Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism, *Fungal biology*, 120(5), 666-678. doi: 10.1016/j.funbio.2016.03.003