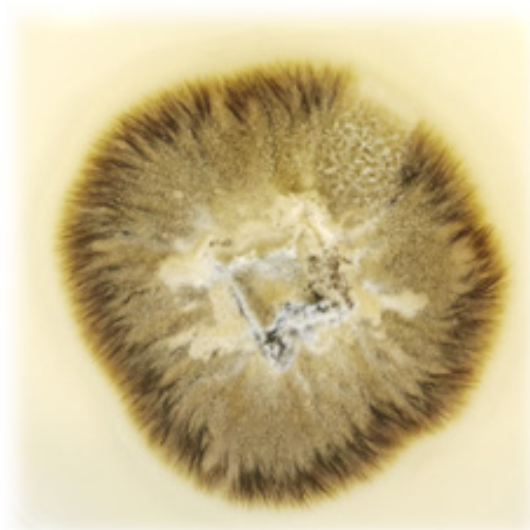
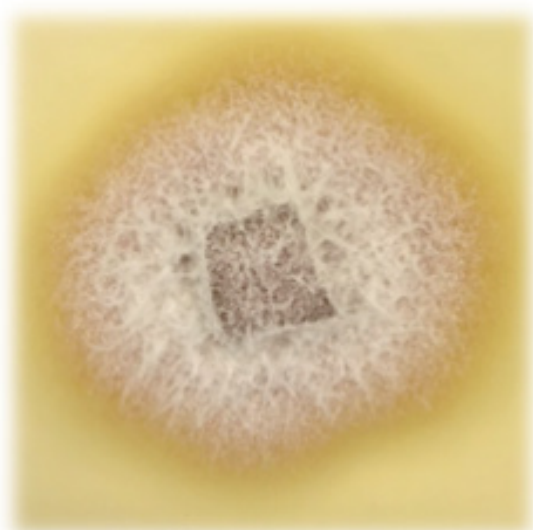
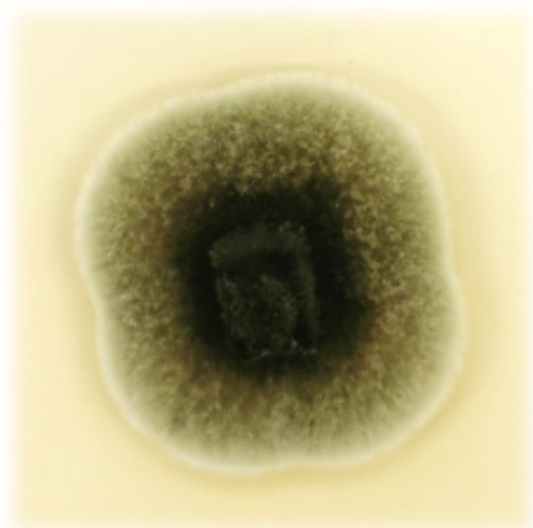


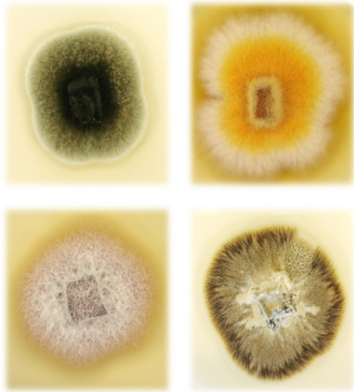
2021 Vol. 12 Št. 1

C S P P

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum



Zgodba iz naslovnice



Glivni endofiti izolirani iz semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) - zgoraj: *Alternaria alternata* (levo), *Epicoccum nigrum* (desno) / spodaj: *Fusarium* sp. (levo), *Didymella* sp. (desno)

Slika: Jure Mravlje

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

Paula Pongrac

Jure Mravlje

Naslov uredništva:

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum,

Zbornik študentov fiziologije rastlin

Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

Izdano: 2021

ISSN 1854-4193 (online: <https://www.bf.uni-lj.si/sl/o-fakulteti/knjiznice-bf/publikacije/2021011412353830/collectanea-studentium-physiologiae-plantarum>)

4 VPLIV BIOFORTIFIKACIJE ZRN NAVADNE AJDE S CINKOM ALI SELENOM NA KALJIVOST IN MINERALNO SESTAVO KALIC KALČKOV

Jošt Prevc, Helena Jakopič, Katarina Fras, Lucija Remic, Nastja Cerjak

9 VPLIV BIOFORTIFIKACIJE ZRN Tatarske ajde (*FAGOPYRUM TATARICUM*) S CINKOM ALI SELENOM NA RAST IN MINERALNO SESTAVO KALČKOV

Anja Cerovšek, Katarina Fras, Marko Rupnik, Zvezdana Samac

13 VPLIV NADMORSKE VIŠINE NA NAVADNO AJDO (*FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH.)

Aleksander Trajbarič, Kristina Krnjak, Ana Kugovnik, Kaja Zajc

18 VPLIV NADMORSKE VIŠINE NA GLIVNO ZDRUŽBO SEMEN Tatarske ajde

Saša Kupčič, Primož Mihelič, Eva Reberšek, Dragana Radivojevič

22 VPLIV HLADNE PLINSKE PLAZME NA KALITEV IN GLIVNO ZDRUŽBO SEMEN NAVADNE AJDE (*FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH.)

Ela Praznik, Leja Perne, Tim Gorše, Viktorija Forte Berlec

27 VPLIV HLADNE PLINSKE PLAZME NA KALITEV IN GLIVNO ZDRUŽBO SEMEN Tatarske ajde (*FAGOPYRUM TATARICUM* (L.) GAERTN.)

Gregor Spruk, Gloria Krapež, Barbara Halas, Tijana Samardžić

31 VPLIV HLADNE PLINSKE PLAZME NA KALJIVOST IN GLIVNO ZDRUŽBO SEMEN PŠENICE SORTE INGENIO

Eva Hajšek, Katarina Lenarčič, Jan Štangelj, Ana Žuran

35 VPLIV HLADNE PLAZME NA KALJIVOST IN GLIVNO ZDRUŽBO SEMEN PŠENICE (*TRITICUM AESTIVUM*) SORTE BERNSTEIN

Belec Nina, Brvar Matic, Pajek Arambašič Neža, Popović Maja

Vpliv biofortifikacije zrn navadne ajde s cinkom ali selenom na kaljivost in mineralno sestavo kalic kalčkov

Jošt Prevc, Helena Jakopič, Katarina Fras, Lucija Remic, Nastja Cerjak

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

- Selen (Se) in cink (Zn) sta esencialna mikroelementa v naši prehrani. V raziskavi smo testirali, kako namakanje zrn v raztopino Se oziroma Zn, kot tip biofortifikacije, vpliva na kopičenje Se in Zn v kalicah navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench).
- Zrna navadne ajde smo namakali v raztopino kalijevega selenata (SeO_4^{2-}), kalijevega selenita (SeO_3^{2-}), cinkovega sulfata (ZnSO_4) oziroma cinkovega klorida (ZnCl_2). Za kontrolo smo zrna namočili v destilirano vodo. Ocenili smo vpliv obravnav na kalitev zrn in na mineralno sestavo v teden dni starih kalicah navadne ajde. Z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo smo v kalicah izmerili koncentracije Zn, Se, fosforja (P), žvepla (S), klora (Cl), kalija (K), kalcija (Ca), mangana (Mn), železa (Fe) in bakra (Cu).
- Ugotovili smo, da obravnavanje s ZnSO_4 in ZnCl_2 zmanjša kaljivost zrn. Kalice so tudi v nadaljnjem razvoju v teh dveh obravnavah slabše uspevale, vendar pa so vsebovale večje koncentracije Zn kot kalice v drugih obravnavah. Pri obravnavah s SeO_4^{2-} in SeO_3^{2-} pa se je v kalicah povečala koncentracija Se v primerjavi s preostalimi obravnavami.
- Namakanje zrn navadne ajde predstavlja uporaben pristop biofortifikacije rastlin, vendar je potrebno nadaljnje raziskovalno delo, da se določijo optimalne koncentracije raztopin za namakanje, ki ne bodo vplivale negativno na rast kalic.

Ključne besede: biofortifikacija, navadna ajda, selen, cink, kaljivost semen, mineralna sestava kalic

Uvod

Ajda (*Fagopyrum* sp.) je psevdožito, ki ne vsebuje glutena in je med pomembnejšimi alternativami žit, saj ima odličen profil makro- in mikrohranil (Pongrac s sod. 2013). Mikrohranila igrajo pomembno vlogo v različnih bioloških procesih in veljajo za esencialne elemente v sledovih, ki prispevajo k normalnim metabolnim aktivnostim rastlin, živali in ljudi (Nagy s sod. 2004). Pri ljudeh je pomanjkanje mikrohranil povezano s kakovostjo hrane, na katero pomembno vpliva sestava prsti, sploh če je le-ta mineralno revna (Bouis in Saltzman 2017; Migliozi s sod. 2015). Za reševanje tovrstnih problemov se uvaja biofortifikacija, to je pristop bogatenja hrane, ki temelji na povečanju vsebnosti mikrohranil v užitnih delih rastlin (Biroli s sod. 2015).

Izmed mikrohranil, katerih vnos v rastline in posledično v ljudi in živali je navadno premajhen, sta Se in Zn. Selen igra pomembno vlogo v življenju ljudi in živali predvsem zato, ker je sestavni del encimov in proteinov. Poleg zmanjšanja oksidativnega stresa je Se vključen tudi v zaščito DNA pred poškodbami in staranjem celic ter pred rakotvornimi učinki z zmanjšanjem reaktivnih kisikovih vrst (de Oliveira s sod. 2018). Pomanjkanje Se v prehrani vpliva na pojav številnih bolezni, vključno s hipotiroidizmom, tumorji, revmatoidnim artritisom in srčnim popuščanjem (D'Amato s sod. 2018). Selen za rastline ni esencialen element. Cink je eden od esencialnih elementov v sledovih pomemben za zdravje ljudi, katerega pomanjkanje negativno vpliva na vsaj eno tretjino svetovnega prebivalstva, zlasti na otroke, predvsem zaradi hudih bolezni, kot so okvara imunskega sistema, zastoj v telesni rasti in hipogonadizem (Hozt s sod. 2004).

Dokazano je, da na absorpcijo Se in Zn v rastlinah vpliva več lastnosti, in sicer oblika, v kateri sta dodana, odmerek in način dodajanja. Pri slednjemu se najpogosteje uporablja foliarno oziroma talno gnojenje. Večina študij potrjuje, da je foliarno gnojenje bolj učinkovit način aplikacije, saj je pri tovrstnem gnojenju višja vsebnost Se in Zn v užitnih delih rastline v primerjavi s talnim gnojenjem (Izydorczyk s sod. 2020).

Vendar pa pri foliarnem gnojenju obstaja nevarnost opeklin listov, poškodb že obstoječih pridelkov, prav tako pa tovrstno gnojenje predstavlja velik strošek in zahteva kompetenten kader (Farooq s sod. 2012). V primeru talnega gnojenja lahko rastline uporabijo le majhne količine mikrohranil, večji del pa je nedostopen zaradi izpiranja ali vezave na talne delce (Idrees s sod., 2018). Kot nova potencialna načina biofortifikacije z mikrohranili se preiskujeta obdelava semen, na katera se nanese prevleka mikrohranil in namakanje semen v hranilni raztopini za določen čas pri izbrani koncentraciji (Farooq s sod. 2009). Za obdelavo semen z namakanjem je potrebno manj hranilnih snovi, zato naj bi bila ta metoda varčnejša od prej omenjenih metod (Farooq s sod. 2012). Trenutno biofortifikacija rastlin s Se temelji predvsem na dodajanju natrijevega selenata (VI) z mineralnim gnojilom, foliarno, ali preko talnega gnojenja (Ranches s sod. 2017). Poleg foliarnega in talnega gnojenja s Zn, pa se že omenja uspešen način biofortifikacije (t.j. tisti, ki je povečal koncentracijo Zn) in sicer prevleka pšeničnega zrnja s $ZnSO_4$ in $ZnCl_2$ (Rehman in Farooq 2016) in namakanje kalečih semen žit in stročnic v raztopino $ZnSO_4$ (Wei s sod. 2012; Haider s sod. 2020).

V naši študiji smo z namakanjem zrn navadne ajde testirali naslednje hipoteze: 1. namakanje v raztopinah kalijevega selenata (SeO_4^{2-}), kalijevega selenita (SeO_3^{2-}), $ZnSO_4$ in $ZnCl_2$

pozitivno vpliva na kaljivost zrn, 2. namakanje v raztopinah (SeO_4^{2-}) in (SeO_3^{2-}) bo povečala vsebnost Se, 3. z namakanjem v raztopinah $ZnSO_4$ in $ZnCl_2$ se bo povečala vsebnost Zn, in 4. na vsebnosti ostalih izmerjenih elementov obravnave ne bodo imele vpliva.

Materiali in metode

Po 10 g zrn navadne ajde smo pri sobni temperaturi namočili v destilirano vodo (kontrola), raztopino kalijevega selenata (SA; $60 \mu M$), kalijevega selenita (SI; $60 \mu M$), raztopino cinkovega sulfata ($ZnSO_4$; 0,5 M) ali v raztopino cinkovega klorida ($ZnCl_2$; 0,1 M). Po 24 h smo zrna izplaknili v destilirani vodi, jih prestavili v plastične banjice na filter papir in jih prešteli. Po pet banjic z zrni (ena banjica za vsako obravnavo) smo vstavili v dva kalilnika in le-ta v rastno komoro (Slika 1). Pogoji v kalilniku so bili: avtomatsko pršenje trikrat na dan (ob 7., 15. in 21. uri), vsakič za 15 minut, pogoji v komori pa: 16 ur svetlobe, 8 ur



Slika 1: Slika poskusa v kalilniku.

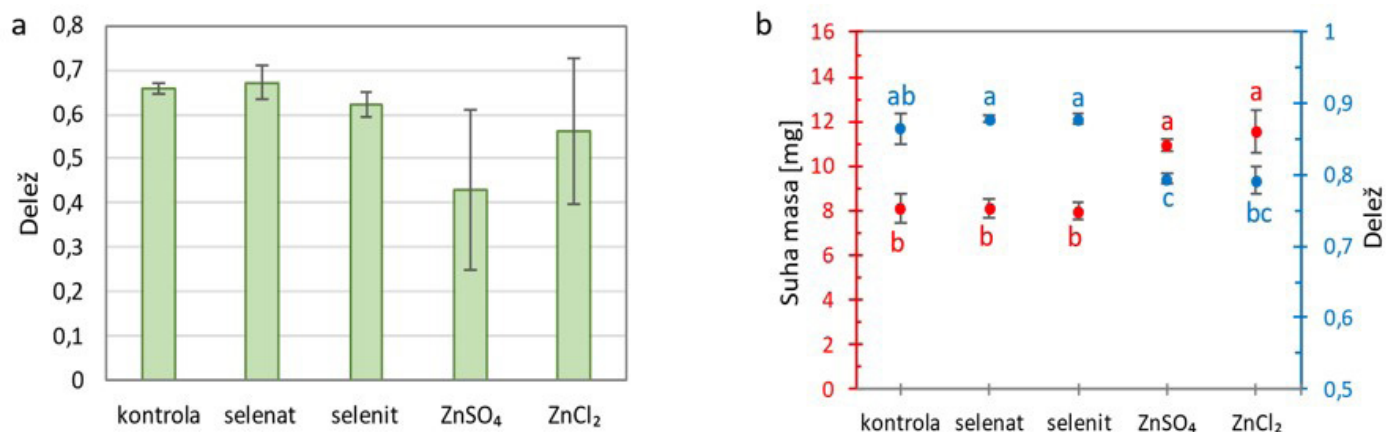
teme in temperatura $24,5^{\circ}C$ dnevna in $20^{\circ}C$ nočna.

Po enem tednu rasti smo rastline slikali, prešteli število skaljenih zrn v posamezni banjici in kalicam odstranili lusko. Kalicam smo odstranili korenine, jih stehtali (sveža masa) in jih sušili 4 dni pri $60^{\circ}C$. Posušen material smo znova stehtali (suha masa), kalice strli v terilnici in pripravili tabletko za analizo mineralne sestave kalic, ki smo jo izvedli z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo.

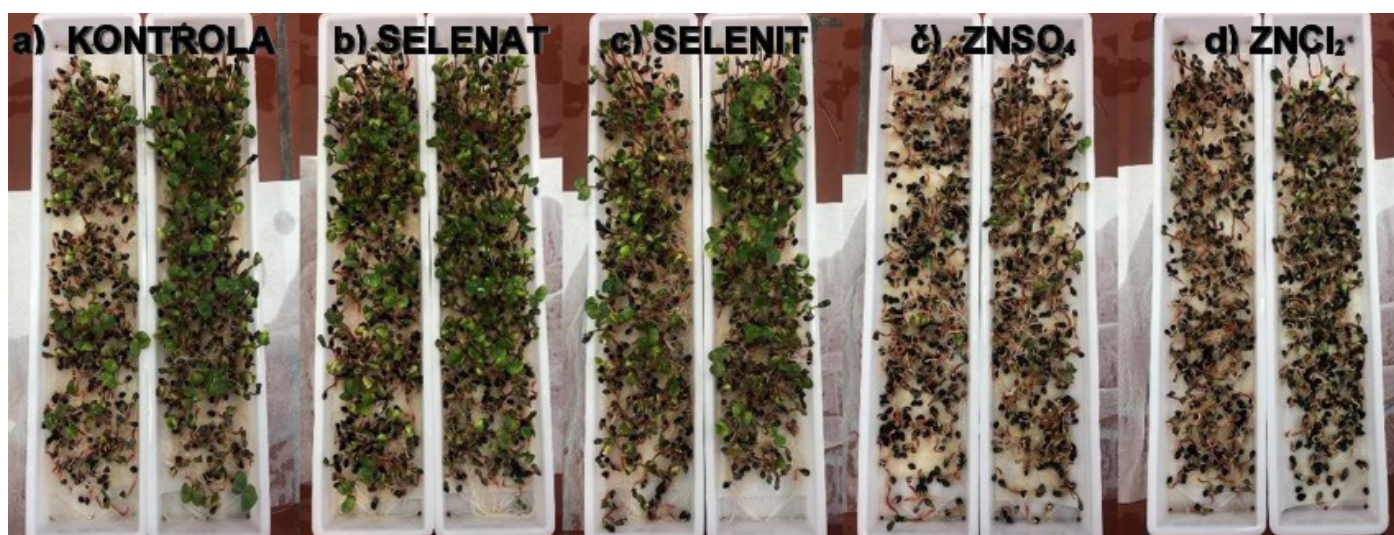
Z množenjem koncentracije elementov in suhe mase kalic smo preračunali vsebnost elementov. Statistično analizo smo opravili s programoma SigmaPlot in MS Excel. Uporabili smo več primernih statističnih testov, za ovrednotenje razlik med obravnavami in sicer enosmerno analizo variance (one-way ANOVA), Holm-Šidák post-hoc test in t-test, oba pri $p < 0,05$. Slika 1: Zrna navadne ajde v kalilniku, ki je bil postavljen v rastno komoro.

Rezultati

Izpostavljenost zrn različnim obravnavam ni imelo značilnega vpliva na kaljenje zrn, je pa pri obravnavah s cinkom ($ZnSO_4$ in $ZnCl_2$) večja variabilnost podatkov (Slika 2 a). Kalice obravnavane s Zn so imele večjo suho maso in so vsebovale manj vode (Slika 2 b). Na sliki 3 (č-d) se prav tako vidi, da so



Slika 2: Delež skaljenih zrn navadne ajde po sedmih dneh, prikazana so povprečja \pm standardna deviacija ($n=2$) (a) in suha masa kalice po sedmih dneh in delež vode v kalici, prikazana so povprečja \pm standardna deviacija ($n=4$) (b). Različne črke nad povprečnimi podatki predstavljajo statistično značilne razlike med obravnavami (Holm-Sidak post-hoc test pri $p < 0,05$).

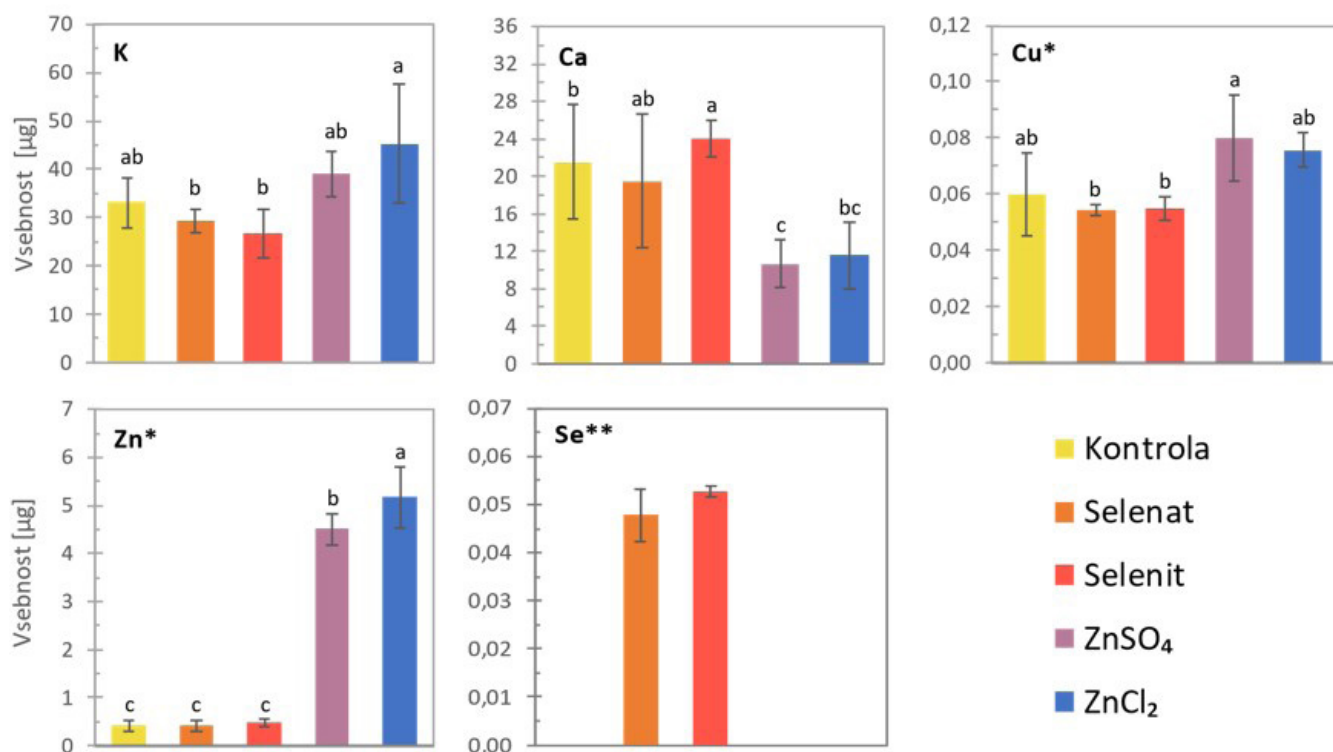


Slika 3: Sedem dni stare kalice navadne ajde, ki so zrastle iz zrn obravnavanih z različnimi raztopinami Se in Zn. Z leve proti desni (a-d: kontrola, selenat, selenit, ZnSO₄, ZnCl₂). Za vsako obravnavo sta bili narejeni dve paralelki.

kalice v teh dveh obravnavah manjše in slabše razvite. Testirane obravnave niso značilno vplivale na vsebnost P, S, Cl, Mn in Fe v kalicah v primerjavi s kontrolo (Slika 4). Kalice iz obravnave s ZnCl₂ so vsebovale več K kakor kalice iz obravnave s kalijevim selenatom in kalijevim selenitom. Največ Ca so vsebovale kalice obravnavane s kalijevim selenitom, medtem ko ni bilo razlik med kontrolo, kalijevim selenatom in ZnCl₂. Najmanj Ca so vsebovale kalice v poskusu s ZnSO₄, ki pa niso bile značilno različne od ZnCl₂. Pri vsebnosti Cu v rastlinah ni bilo bistvenih razlik med obravnavami in kontrolo, so pa tiste pri obravnavi s Se (kalijev selenat in selenit) imele manj Cu kakor tiste obravnavane s ZnSO₄. Največji vpliv na vsebnost Zn v kalicah je imela obravnava s ZnCl₂, sledijo kalice iz obravnave s ZnSO₄, medtem ko kalice iz ostalih obravnave vsebovale značilno manj Zn. Največ Se so imele rastline obravnavane s selenovimi solmi (kalijev selenat, kalijev selenit). Pri kontrolni skupini in kalicah iz obravnave s ZnSO₄ in ZnCl₂ smo bili z metodo XRF na meji detekcije (nismo zaznali Se).

Diskusija

Vsebnost Zn v kalicah navadne ajde se je po namakanju zrn v raztopinah ZnSO₄ in ZnCl₂ povečala. Namakanje zrn v raztopini ZnCl₂ je vplivalo na povečanje vsebnosti Zn bolj kot namakanje v raztopini ZnSO₄ (Slika 4). Dokazano je bilo da večja vsebnost Zn v zrnih poveča pridelok različnih žitaric in drugih poljščin (pšenice, riža, fižola, čičerike itd.) (Rashid s sod. 2019; Ullah s sod. 2019). Cink v rastlini poveča fiksacijo CO₂ in zviša vsebnost klorofila, oboje pa poveča fotosintezno aktivnost. Poveča se tudi sinteza avksina in odpornost rastline na stres. Vse to skupaj pa izboljša rast in pridelok rastline (Chattha s sod. 2017; Hassan s sod. 2019). Glede na pridobljene rezultate kaljivosti navadne ajde, je razvidno da se je delež kaljivosti zmanjšal (Slika 3). Najverjetnejši razlog za zmanjšan delež je bila prevelika koncentracija raztopin ZnSO₄ (0,5 M) in ZnCl₂ (0,1 M) s katerima smo obravnavali zrna. V kalicah izmerjene koncentracije veljajo, glede na literaturo, za rastline že toksične. Cink se v prevelikih količinah obnaša kot težka kovina in ima na rastline kvarni učinek. Le-ti se pri različnih rastlinah začnejo kazati pri različnih koncentracijah. Najpogosteje so vidni kvarni učinki pri koncentracijah Zn v listih nad 300 mg



Slika 4: Vsebnost elementov v sedem dneh starih kalicah navadne ajde (kalij, K; kalcij, Ca; baker, Cu; cink, Zn in selen, Se). Stolpci predstavljajo povprečne vrednosti \pm standardna deviacija ($n = 4$). Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med obravnavami (Holm-Sidakov post-hoc test pri $p < 0,05$). *, nehomogena varianca; kljub temu upoštevamo Holm-Sidakov test pri $p < 0,05$; **, t-test pri $p < 0,05$.

Zn kg^{-1} suhe mase oziroma se lahko kažejo že nad 100 mg kg^{-1} suhe mase (Broadley s sod. 2007). Koncentracije Zn v kalicah iz našega poskusa pa so presegale to količino (povprečne koncentracije je $430 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ suhe mase). Koncentracije od $0,01 \text{ M}$ do $0,1 \text{ M}$ bi bile primernejše in bi glede na znane učinke Zn pri čičeriki (Ullah s sod. 2019) lahko povečale kaljivost.

Biofortifikacija z namakanjem semen in zrn dokazano zviša vsebnost Zn v vegetativnih delih rastlin, so pa vsebnosti Zn najvišje, tako v vegetativnih kot reproduktivnih delih rastline, pri foliarnem gnojenju oziroma najboljše pri kombinaciji talnega in foliarnega gnojenja. Prednost namakanja semen kot načina gnojenja, je v lažji in bolj ekonomični uporabi kot pri foliarnem in talnem gnojenju. Na vsebnost Zn v užitnih delih rastline vpliva prenos elementa iz listov v zrnje v reproduktivni fazi rastline. Da pa je omogočen prenos dovolj velikih količin elementa, za doseg željenih koncentracij Zn v zrnju in kasneje v proizvodih iz le-tega, pa je smiselno uporabiti kombinacijo vseh omenjenih načinov gnojenja, predvsem je pomembno omenjeno foliarno gnojenje v fazi prenosa elementa v zrnje (Chattha s sod. 2017).

Vsebnost Se v kalicah je bila bistveno povečana po obravnavi zrn s kalijevim selenatom in kalijevim selenitom. Analiza s t-testom je pokazala, da tip Se ni vplival na količino Se v kalicah (Slika 4). Količina Se je bila pri ostalih obravnavah in kontroli pod mejo detekcije, zato je ničelna. Glede na to, da rastline iz tal privzemajo Se pretežno v obliki selenata ali selenita (Zhu s sod. 2009) so takšni rezultati pričakovani.

Na znižano vsebnost Ca v kalicah sta vplivali obravnavi s ZnSO_4 in ZnCl_2 . Kalcij je pomemben makrohranutrient v mineralni prehrani rastlin in je slabo mobilni element. Njegovo

pomanjkanje v rastlinah se kaže predvsem pri mladih rastlinah in sicer kot nekroza mladih meristemskih regij na koncih korenin in mladih listov, počasnejša rast rastlin, razvejane, krajše in rjavo obarvane korenine (Taiz s sod. 2018). Te znake bi lahko povezali tudi z našimi rezultati pri slabšem uspevanju kalic pri obravnavah s ZnSO_4 in ZnCl_2 . Povečana prisotnost Zn v substratu oz. v raztopini lahko ovira dostopnost kalcija, saj lahko pride do tvorbe kalcijevega cinkata, ki v vodi ni dobro topen in tako Ca ni razpoložljiv v primernih koncentracijah za rastlino (Prasad s sod. 2016).

Pri vsebnostih K in Cu smo po opravljenih statističnih analizah sicer dobili določene statistične razlike med obravnavami, vendar na podlagi tega težko sklepamo o vplivu posameznih obravnav na vsebnost kalija oz. bakra. Za boljše interpretacijo teh rezultatov bi tako bili potrebni dodatni poskusi. Kot že omenjeno v rezultatih, pa obravnave niso imele značilnega vpliva na vsebnost P, S, Cl, Mn in Fe v posamezni kalici.

Zaključki

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da ima izbran način biofortifikacije s kalijevim selenatom in kalijevim selenitom vpliv na povišano vsebnost Se v kalicah navadne ajde. Vsebnost Ca v kalicah je bila večja od kontrole le pri obravnavi s kalijevim selenitom. Vsebnost ostalih elementov v kalicah obravnavanih s tema dvema raztopinama pa se od kontrole statistično značilno ni razlikovala. Pri biofortifikaciji s ZnCl_2 in ZnSO_4 smo uporabili preveliko koncentracijo Zn v raztopini, ki pa je bila za rastline že toksična, kar se je opazilo z manjšim kaljenjem zrn in manjšo rastjo kalic. Opazili smo tudi, da rastline obravnavane s ZnSO_4 vsebujejo manj Ca kot kalice iz drugih obravnav. Kot pričakovano pa je bila pri obravnavah

s Zn vsebnost tega elementa bistveno višja od ostalih. Zaradi uporabe prevelike koncentracije Zn v obravnavi, ne moremo zaključiti, kakšne učinke bi imele nižje koncentracije Zn v raztopini, na vsebnost elementov v kalih navadne ajde. Glede na pridobljene koncentracije Zn in Se v obogatenih zrnih bi z uživanjem kalic pokrili priporočene dnevne vnose (PDV) za izbrana mikroelementa. Z zaužitjem 110 g svežih kalic bi pokrili PDV Zn za odrasle, ki znaša 10 mg in z zaužitjem 72 g svežih kalic bi pokrili PDV za Se za odrasle, ki znaša 55 µg (Inštitut za nutricionistko, 2021).

Z nadaljnimi raziskavami bi bilo smiselno izmeriti vsebnost elementov v zrnih ajde, ki je zrasla iz teh namočenih zrn, da bi preverili, ali obstajajo dolgoročne posledice povečanih koncentracij Se oziroma Zn. S tem bi preverili, kakšna je povezava med povišanjem oziroma znižanjem vsebnosti elementov v rastlini in z vsebnostjo le-teh v zrnih naslednje generacije.

Literatura

1. Birol E, Meenakshi JV, Oparinde A, Perez S, Tomlins K, 2015. Developing country consumers' acceptance of biofortified foods: a synthesis. *Food Security* 7:555–568.
2. Bouis HE, Saltzman A, 2017. Improving nutrition through biofortification: a review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global Food Security* 12:49–58.
3. Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A, 2007. Zinc in plants. *New Phytologist* 173:677–702.
4. Chattha MU, Hassan MU, Khan I, Chattha MB, Mahmood A, Chattha MU, Nawaz M, Subhani MN, Kharal M, Khan S, 2017. Biofortification of wheat cultivars to combat zinc deficiency. *Frontiers in Plant Science* 14, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00281>
5. D'Amato R, Fontanella MC, Falcinelli B, Beone GM, Bravi E, Marconi O, Benincasa P, Businelli D, 2018. Selenium biofortification in rice (*Oryza sativa* L.) sprouting: effects on Se yield and nutritional traits with focus on phenolic acid profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 16:4082–4090.
6. de Oliveira VC, Faquin V, Guimaraes KC, Andrade FR, Pereira J, Guilherme LRG, 2018. Agronomic biofortification of carrot with selenium. *Ciencia e Agrotecnologia* 2:138–147.
7. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. 12, Zinc, 2001. Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Washington (DC): National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK222317/> (13. jan. 2021)
8. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. 7, Selenium, 2000. Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Washington (DC): National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225470/> (13. jan. 2021)
9. Farooq M, Wahid A, Siddique KHM, 2012. Micronutrient application through seed treatments—a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 1:125–142.
10. Farooq M, Basra S, Wahid A, Khaliq A, Kobayashi N, 2009. Rice Seed Invigoration: A Review. In: Lichtfouse E. (eds) *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants*. str. 137–175. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9654-9_9 (4. jan. 2021)
11. Haider MU, Hussain M, Farooq M, Nawaz A, 2020. Optimizing zinc seed priming for improving the growth, yield and grain biofortification of mungbean (*Vigna radiata* (L.) wilczek). *Journal of Plant Nutrition* 10:1438–1446.
12. Hassan N, Irshad S, Saddiq MS, Bashir S, Khan S, Wahid MA, Khan RR, Youstra M, 2019. Potential of zinc seed treatment in improving stand establishment, phenology, yield and grain biofortification of wheat. *Journal of Plant Nutrition* 14:1676–1692.
13. Idrees M, Cheema SA, Farooq M, Wakeel A, 2018. Selenium nutrition for yield enhancement and grain biofortification of wheat through different application methods. *International Journal of Agriculture and Biology* 8:1701–1709.
14. Izydorczyk G, Ligas B, Mikula K, Witek-Krowiak A, Moustakas K, Chojnacka K, 2021. Biofortification of edible plants with selenium and iodine. *Science of the Total Environment* 754, in press <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141983>
15. Marchner P, 2012. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Elsevier/Academic Press, Boston, USA.
16. Migliozi M, Thavarajah D, Thavarajah P, Smith P, 2015. Lentil and kale: complementary nutrient-rich whole food sources to combat micronutrient and calorie malnutrition. *Nutrients* 11:9285–9298.
17. Nagy P, Bakonyi G, Bongers T, Kádár I, Fábrián M, Kiss I, 2004. Effects of microelements on soil nematode assemblages seven years after contaminating an agricultural field. *Science of the Total Environment* 2-3:131–143.
18. Pongrac P, Vogel-Mikuš K, Jeromel L, Vavpetič P, Pelicon P, Kaulich B, Kreft I, 2013. Spatially resolved distributions of the mineral elements in the grain of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Food Research International* 1:125–131.
19. Prasad R, Shivay YS, Kumar D, 2016. Interactions of zinc with other nutrients in soils and plants—A review. *Indian Journal of Fertilisers* 5:16–26.
20. Ranches J, Vendramini JMB, Arthington JD, 2017. Effects of selenium biofortification of hayfields on measures of selenium status in cows and calves consuming these forages. *Journal of Animal Science* 1:120–128.
21. Rashid A, Ram H, Zou C, Rerkasem B, Duarte AP, Simunji S, Yazici A, Guo S, Rizwan M, Bal RS, Wang Z, Malik SS, Phattarakul N, de Freitas R, Lungu O, Barros VLNP, Cakmak I, 2019. Effect of zinc-biofortified seeds on grain yield of wheat, rice, and common bean grown in six countries. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 182:791–804.
22. Rehman A, Farooq M, 2016. Zinc seed coating improves the growth, grain yield and grain biofortification of bread wheat. *Acta Physiologiae Plantarum* 38(238), 238. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2250-3>
23. Taiz L, Zeiger E, 2018. *Plant Physiology and Development*. Sinauer Associates, Oxford University Press, New York, USA.
24. Thavarajah D, Abare A, Mapa I, Coyne C, Thavarajah P, Kumar S, 2017. Selecting lentil accessions for global selenium biofortification. *Plants* 34:1–11.
25. Ullah A, Farooq M, Hussain M, Ahmad I and R, Wakeel A, 2019. Zinc seed priming improves stand establishment, tissue zinc concentration and early seedling growth of chickpea. *The Journal of Animal and Plant Sciences* 4:1046–1053.
26. Wei Y, Shohag MJI, Wang Y, Lu L, Wu C, Yang X, 2012. Effect of zinc sulfate fortification in germinated brown rice on seed zinc concentration, bioavailability, and seed germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 7: 1871–1879.
27. Zhu YG, Pilon-Smits EAH, Zhao FJ, Williams PN, Meharg A, 2009. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science* 8:436–442.

Vpliv biofortifikacije zrn tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) s cinkom ali selenom na rast in mineralno sestavo kalčkov

Anja Cerovšek, Katarina Fras, Marko Rupnik, Zvezdana Samac

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

- Namen raziskave je bil ugotoviti vpliv namakanja zrn tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) v raztopinah K_2SeO_4 , K_2SeO_3 , $ZnSO_4$ in $ZnCl_2$ na rast in razvoj kalčkov, ter kako namakanje vpliva na mineralno sestavo kalčkov.
- Zrna tatarske ajde smo namakali v različnih raztopinah (obravnave) in nato kalili v kalilni komori. Določili smo suho maso kalčkov, dobljeni material strli v terilnici, pripravili tabletko in izmerili koncentracije elementov z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo.
- Koncentracija Se je bila povečana pri obravnava z raztopinama K_2SeO_4 in K_2SeO_3 , prav tako tudi koncentracija Zn pri obravnava z raztopinama $ZnSO_4$ in $ZnCl_2$.
- Rezultati kažejo, da je biofortifikacija z namakanjem zrn učinkovit način za povečanje koncentracije Zn in Se v kalčkih tatarske ajde, na suho maso kalčkov pa ni imela bistvenega vpliva.

Ključne besede: Pomanjkanje mineralov, prehrana, mikrohranila, razvoj kalčkov, rentgenska fluorescenčna spektrometrija

Uvod

Zrna tatarske ajde so uporabna kot pomemben funkcionalen živilski material, saj vsebujejo veliko beljakovin, uravnoteženo aminokislinsko sestavo, razmeroma veliko vlaknin ter vitaminov in mineralov, prav tako pa ne vsebujejo glutena (Fabjan in sod. 2003). Ljudje potrebujemo več kot 22 mineralnih elementov, katere lahko dobimo z ustrežno prehrano, vendar prehrana populacij, ki se preživljajo le z žiti, pogosto nima zadostne količine Fe, Zn, Ca, Mg, Cu, I ali Se (White in Broadley 2005). Biofortifikacija je izvedljivo in stroškovno učinkovito sredstvo za dovajanje mikrohranil, skozi gojenje zrna oziroma semena, populacijam, ki imajo omejen dostop do raznovrstnih živil in drugih problemov na področju mikrohranil (Bouis in Saltzman, 2017). Veliko raziskav je bilo narejenih na navadni ajdi (*Fagopyrum esculentum* L.) in navadni pšenici (*Triticum aestivum* L.), kjer je bila po biofortifikaciji s Se, dodanim foliarno, ugotovljena povečana koncentracija Se (Germ in Gaberščik 2016). Podobno je bilo raziskano in dokazano tudi pri dvozrni pšenici (*Triticum dicoccon* L.), kjer je bila koncentracija Zn pri gojenju kalčkov večja po biofortifikaciji prsti s Zn (koncentracija dodanega Zn je odvisna od pH prsti), prav tako pa naj bi povečana koncentracija Zn spodbudila kalitev zrn (Cakmak 2007). V študiji Zhao s sod. (2019) prav tako opisujejo dodajanje Zn, v obliki raztopine $ZnSO_4$, zrnem navadne pšenice direktno v prst, a so kot rezultat, poleg povečane koncentracije Zn, opazili tudi povečano koncentracijo S.

Namen raziskave je bil preveriti vpliv namakanja zrn tatarske ajde v raztopinah K_2SeO_3 , K_2SeO_4 , $ZnSO_4$ in $ZnCl_2$ na rast in razvoj kalčkov, primerjati obravnave med sabo ter s kontrolo, ki je bila namočena v destilirani vodi. Predpostavili smo, da bodo obravnavana zrna bolje kalila od tistih namočenih v destilirani vodi. Prav tako smo želeli preveriti, kako se je spremenila mineralna sestava kalčkov, kar smo preverili s pomočjo rentgenske fluorescenčne spektrometrije. Pri merjenju koncentracije elementov (S, Cl, Zn in Se) smo predpostavili, da bo le ta višja pri obravnavanih kalčkih.

Materiali in metode

Vzgoja kalčkov

Pripravili smo naslednje raztopine: $60 \mu M K_2SeO_3$, $60 \mu M K_2SeO_4$, $0,5 M ZnSO_4$ in $0,1 M ZnCl_2$, ter kontrolno raztopino, destilirano vodo. V vsako raztopino smo dodali po 10 g zrn tatarske ajde in zrna pustili v raztopini 24 ur pri sobni temperaturi. Zrna smo nato sprali z destilirano vodo in jih prestavili v kalilnik, ki jih je škropil z vodo na 8 ur po 15 minut. V rastni komori je bil 16 urni dan in 8 urna noč. Po sedmih dneh smo kalčkom odrezali korenine in jih sušili v sušilniku 4 dni pri $60^\circ C$.

Priprava in analiza vzorcev

Posušene rastline smo stekali (suha masa) in material strli v terilnici. S pomočjo hidravlične stiskalnice smo iz materiala pripravili tabletko, katerih masa je bil med 100 in 200 mg. Temu je sledila meritev koncentracij P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Zn in Se z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo. Uporabili smo rentgenski spektrometer Peduzo T02 (IJS) z Rh anodo in SDD detektorjem (Amptek, ZDA). Metoda temelji na

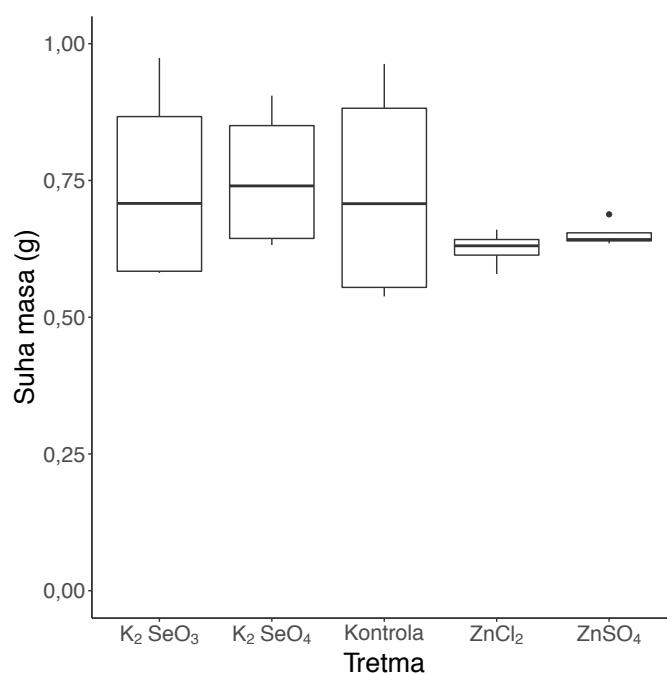
emisiji sekundarnih žarkov iz elementov v preiskovanem materialu, ki je bil obsevan z visoko energijskimi žarki (van Maarschalkerweerd in Husted 2015).

Statistična analiza

Rezultate smo prikazali na grafih in jih obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA) s Holm-Sidak Post hoc testom in t-testom (razlike so statistično pomembne pri $p < 0,05$) v programu SigmaPlot (Systat Software).

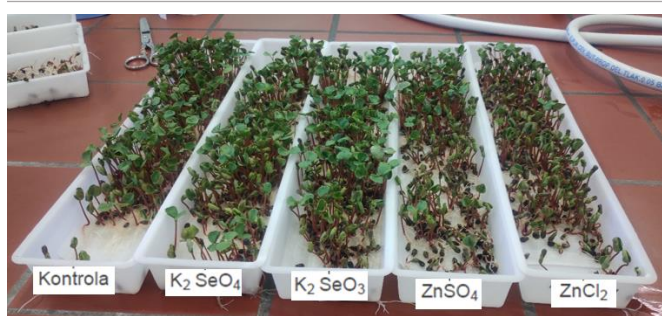
Rezultati

Mediane mas kalčkov različnih obravnave so bile med seboj primerljive ($p=0.767$). Grafičen prikaz podatkov suhe mase pri različnih tretmajih je prikazan na Sliki 1, izgled sedem dni starih kalčkov pa na Sliki 2.

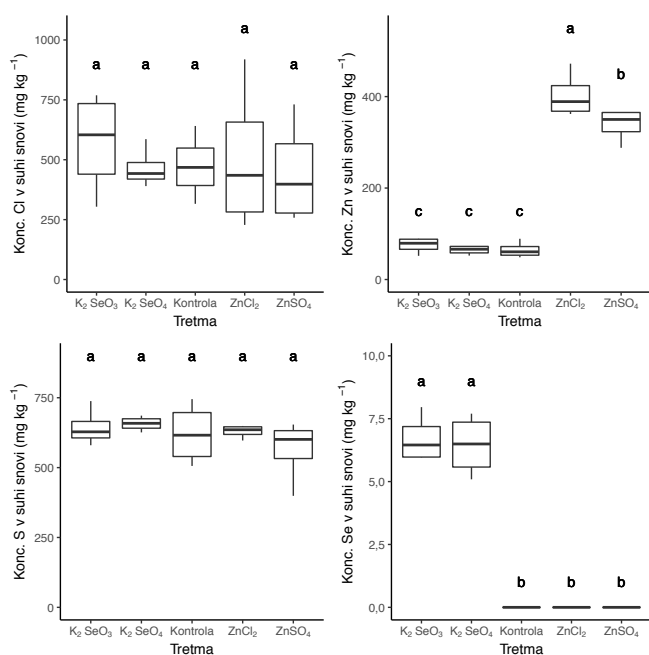


Slika 1: Suha masa kalčkov tatarske ajde po sedmih dneh. Zrna so bila namočena v raztopini K_2SeO_3 , K_2SeO_4 , $ZnCl_2$ ali $ZnSO_4$. Sredinska črta vsake škatle z brki predstavlja mediano, horizontalni stranici predstavljata 1. in 3. kvartil, brki najvišjo in najnižjo vrednost ($n=4$), oziroma v primeru $ZnSO_4$ vrednosti, ki zelo odstopa od ostalih meritev. Razlike v medianah med skupinami so bile premajhne, da bi sklepali na statistično značilne razlike v masah kalčkov ($p=0.767$). Tretmaji na rast kalčkov ne vplivajo.

Do značilne razlike v koncentraciji ni prišlo pri elementih, ki niso bili v raztopinah s katerimi smo tretirali zrna ajde (Holm-Sidak test pri $p > 0,05$). Ker meritve niso pokazale odstopanj koncentracij elementov drugje kot pri Se in Zn v nadaljevanju ne prikazemo vseh elementov glede na tretma. Zaradi poenostavitve smo grafično prikazali rezultate za elemente, ki so bili prisotni v raztopinah tretmajev (Cl in S) (Slika 3). Do statistično značilnih razlik v elementarni sestavi prihaja samo v koncentracijah Zn in Se (Holm-Sidak test pri $p < 0,05$).



Slika 2: Sedem dni stari kalčki tatarske ajde v pladnjih. Od leve proti desni si sledijo tretmaji, prvi je kontrolni tretma z destilirano vodo, sledijo mu raztopine K_2SeO_4 , K_2SeO_3 , $ZnSO_4$ in $ZnCl_2$. Semena so v vseh kalilnikih uspešno vzkllila. Med njimi ni bilo značilne statistične razlike v biomasi.



Slika 3: Koncentracije Cl, Zn, S in Se v sedem dni starih kalčkih tatarske ajde. Zrna so bila namočena v raztopini K_2SeO_3 , K_2SeO_4 , $ZnCl_2$ ali $ZnSO_4$. Sredinska črta vsake škatle z brki predstavlja mediano, horizontalni stranici predstavljata 1. in 3. kvartil, brki najvišjo in najnižjo vrednost ($n=4$). Različne črke nad škatlami predstavljajo statistično značilne razlike (Holm-Sidak test pri $p < 0,05$).

Diskusija

Preverili smo suho maso kalčkov glede na tretma in ugotovili, da se mase kalčkov različnih obravnav niso statistično značilno razlikovale. Nasprotno Germ in Gaberščik (2016) pri poskusu s foliarnim tretiranjem kalčkov s Se opisujeta povečanje suhe mase kalčkov v primerjavi s kontrolo (uporabili sta 10 mg/L foliarno dodanega Se). Razlog za povečano rast kalčkov pa naj bi bila posledica antioksidativne funkcije Se (Germ in Gaberščik, 2016), ki pa se je pokazala šele ob foliarnem tretiranju samih kalčkov in ne kot posledica namakanja zrn. So pa kalčki, vzgojeni iz zrn namočenih v raztopini s Se in v destilirani vodi v našem poskusu na videz izgledali bolj razviti kot kalčki, ki so bili vzgojeni iz zrn namočenih v raztopini s Zn, kar nakazuje na negativen vpliv Zn, čeprav le-to ni bilo razvidno iz njihove suhe mase. V prihodnje bi bilo smiselno

v tovrstne raziskave vključiti dodatne biokemijske analize za oceno rasti in razvoja kalčkov. Pozorni moramo biti tudi pri koncentraciji dodanih mineralov. V študiji Pongrac s sod. (2016) so ugotavljali spremembe v sestavi mineralnih elementov in bioaktivnih spojin tartarske ajde kot rezultat gojenja v vodah z različno mineralno sestavo. Ugotovili so namreč, da prevelika koncentracija mineralov lahko posega v sekundarni metabolizem kalčkov in lahko celo negativno vpliva na njihovo rast. To naj bi bila posledica mehanizmov, ki vodijo do toksičnosti, neravnovesij in interakcije mineralnih elementov. V kalčkih tatarske ajde iz naših poskusov so bile koncentracije elementov Cl, S in Zn nad mejami zaznavnosti pri vseh obdelavah, medtem ko so bile koncentracije Se nad mejo detekcije ($<5 \text{ mg / kg}$) samo v zrnih tretiranih z raztopino SeO_4 in SeO_3 . Rezultati koncentracije elementov nam razkrijejo, da je koncentracija Se v zrnih obravnavanih z raztopinama SeO_4 in SeO_3 najvišja in se ne glede na uporabljeno raztopino SeO_4 ali SeO_3 med seboj ne razlikujejo. Germ in Gaberščik (2016) poročata o podobnih rezultatih, kjer so rezultati foliarne biofortifikacije kalčkov tatarske ajde tudi pokazali povišano koncentracijo Se. Koncentraciji S in Cl v kalčkih iz našega poskusa se nista značilno razlikovali med tretmaji. Koncentracija Zn pa je bila največja pri tretmaju z raztopino $ZnCl_2$, značilno manjša pa pri raztopini $ZnSO_4$, kjer pa je še vedno presegala koncentracijo Zn v drugih tretmajih. Glede na rezultate lahko sklepamo na uspešno selektivno višanje koncentracije zelenih elementov brez značilne spremembe siceršnje sestave kalčkov tatarske ajde in njihove biomase. Pongrac s sod (2016) ugotavljajo tudi, da se koncentracija nekaterih elementov v kalčkih pri mineralno bogatem tretmaju poviša, nekaterih pa zniža. Opozarjajo, da mineralno srednje obogatena voda (Radenska) povzroči povišane koncentracije Na, Mg, K in Mn ter zmanjša koncentracijo Ca in Zn v kalčkih tatarske ajde v primerjavi z kalčki gojenimi v vodovodni vodi. Namen biofortifikacije je povečanje koncentracije določenih elementov v rastlinah za prehrano ljudi, predvsem Zn in Se, saj pomanjkanje predvsem le-teh ostaja svetovni problem (Carey in sod. 2012). Ugotovili smo, da je namakanje zrna tatarske ajde značilno vplivalo na povečanje koncentracije Zn in Se v užitne dele rastline (kalčke). Če želimo povečati koncentracijo Zn v kalčkih je za to bolje uporabiti tretma z raztopino $ZnCl_2$.

Zaključki

Med kalčki, ki so bili tretirani z raztopinami K_2SeO_3 , K_2SeO_4 , $ZnCl_2$ in $ZnSO_4$ ni statistično značilne razlike v biomasi. Koncentracija Se se je povečala pri kalčkih, ki so zrasli iz zrn namočenih v raztopini K_2SeO_4 in K_2SeO_3 . Koncentracija Zn se je pri tretmaju s $ZnCl_2$ bolj povečala, kot pri tretmaju z $ZnSO_4$. Koncentracije S in Cl v kalčkih tatarske ajde se niso spreminjale v odvisnosti od namakanja v raztopini $ZnSO_4$ oziroma $ZnCl_2$.

Literatura

1. Bouis HE, Saltzman A, 2017. Improving nutrition through biofortification: A review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global Food Security* 12:49-58.
2. Cakmak I, 2007. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification. *Plant and Soil* 302:1-17.
3. Carey AM, Lombi E, Donner E, de Jonge MD, Punshon T, Jackson BP, Guerinot ML, Price AH, Meharg AA, 2012. A review of recent developments in the speciation and location of arsenic and

- selenium in rice grain. Analytical and Bioanalytical Chemistry 402:3275-3286.
4. Fabjan N, Rode J, Košir IJ, Wang Z, Zhang Z, Kreft I, 2003. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:6452-6455.
 5. Germ, M, Gaberščik A, 2016. The effect of environmental factors on buckwheat. In: Zhou in sod. (ur) Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat. Academic Press, Elsevier
 6. Pongrac P, Potisek M, Fraš A, Likar M, Budič B, Myszka K, Boros D, Nečemer M, Kelemen M, Vavpetič P, Pelicon P, Vogel-Mikuš K, Regvar M, Kreft I, 2016. Composition of mineral elements and bioactive compounds in tartary buckwheat and wheat sprouts as affected by natural mineral-rich water. Journal of Cereal Science 69: 9-16.
 7. van Maarschalkerweerd M, Husted S, 2015. Recent developments in fast spectroscopy for plant mineral analysis. Frontiers in Plant Science, 6:1-15.
 8. White PJ, Broadley MR, 2005. Biofortifying crops with essential mineral elements. Trends in Plant Science 10(12):586-593.
 9. Zhao AQ, Wang BN, Tian WH, Yang XB, 2019. Combined soil and foliar ZnSO₄ application improves wheat grain Zn concentration and Zn fractions in a calcareous soil. European Journal of Soil Science, 71(4):681-694.

Vpliv nadmorske višine na navadno ajdo (*Fagopyrum esculentum* Moench.)

Aleksander Trajbarič, Kristina Krnjak, Ana Kugovnik, Kaja Zajc

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

- Namen študije je bil ugotoviti, kako nadmorska višina vpliva na stopnjo kalitve, koncentracijo skupnih fenolnih snovi in pojavnost glivnih endofitov v semenih navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*, Moench.).
- Pri študiji smo se poslužili površinske sterilizacije semen, kalitvenega testa, določitve vsebnosti skupnih fenolov ter gojenja in izolacije posameznih morfotipov endofitnih gliv.
- Kalitveni test je pokazal, da so semena iz najnižje lokacije v Ljubljani - BF (300 m nadm. v.) kalile najboljše, medtem ko je bila stopnja kalitve semen ostalih dveh lokacij, Ilirske Bistrice - IL (600 m nadm. v.) in Črne na Koroškem - ČK (1100 m nadm. v.), minimalna. Skupnih fenolov je bilo v semenih na lokaciji BF skoraj štirikrat več kot na ostalih dveh lokacijah, IL in ČK. Vsebnost skupnih fenolov se med lokacijama IL in ČK ni razlikovala. Iz semen lokacije BF je zrastle najmanj gliv glede na stopnjo preraščenosti gojišč, prav tako je bila stopnja diverzitete pojavnosti morfotipov nizka, saj smo zaznali le štiri od skupno desetih morfotipov. Še manjšo diverzitetu glivnih morfotipov je imela lokacija IL, kjer smo zaznali le tri, vendar je bila stopnja rasti le-teh nad 90-odstotna, saj so bile skoraj vsa gojišča popolnoma preraščena. Lokacija ČK je imela okoli 60-odstotno preraščenost plošč in največjo diverzitetu gliv, saj smo ji določili kar devet od desetih glivnih morfotipov.
- Naši rezultati nimajo zanesljive napovedne vrednosti, saj smo za poskuse uporabili različno stara semena – za lokacijo BF so bila uporabljena eno leto stara semena, za drugi dve lokaciji pa semena tekočega leta.

Ključne besede: endofiti, fenoli, nadmorska višina, navadna ajda, semena

Uvod

Ajda je kulturna rastlina, ki spada med dresnovke (Polygonaceae). Poznamo več vrst, najbolj znani in preučeni sta navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench.) in tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.). Odlikuje ju vsebnost mnogih bioaktivnih snovi, kot so fenoli, ki med drugim sodelujejo pri ohranjanju zdravja človeka (Gimenéz-Bastida in Zieliński, 2015). Njihovo zdravilno delovanje so opisali kot antioksidativno, protitumorsko, protidiabetično in protivnetno (Gimenéz-Bastida in Zieliński, 2015; Jing in sod., 2016; Kreft, 2016). Pri razvoju ajde se pomembna vloga bioaktivnih snovi kaže v njihovem antioksidativnem delovanju, ki predstavlja odgovor na prekomerne koncentracije reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) (Zhang in Bjorn, 2009). Pomembno vlogo pri razvoju rastline imajo tudi glivni endofiti, ki so zelo raznoliki in prisotni v vseh delih rastline (Faeth in Fagan, 2002). Ker lahko vplivajo na kvaliteto semen, so podatki o vsebnosti endofitov v semenih ključnega pomena. Nekatere vrste gliv namreč sintetizirajo mikotoksine, ki so nevarni za zdravje ljudi, nekateri pa so genotoksični. Poleg tega lahko toksini in zunajcelični encimi gliv inhibirajo kalitev semen ali posredno poslabšajo njihovo kakovost (Kovačec in sod., 2016).

Pri našem poskusu smo uporabili semena navadne ajde, pri katerih smo preučili, kako se z nadmorsko višino spreminjajo kaljivost, koncentracija skupnih fenolov in prisotnost različnih endofitnih gliv. Zanimalo nas je, ali obstaja povezava med nadmorsko višino in posameznim dejavnikom. Izhajali smo iz študij po Yuan in sod. (2018), kjer so se ukvarjali z diverziteteto endofitov ter po Zhang in Bjorn (2009), kjer so preverjali vpliv UV sevanja na koncentracijo antioksidantov. Kako nadmorska višina gojenja semen navadne ajde vpliva na njihovo kaljivost še ni bilo raziskano. Ajda je bila gojena na treh različnih lokacijah in sicer v Ljubljani (Biotehniška fakulteta z nadmorsko višino pribl. 300 m), Ilirski Bistrici (Podbeže z nadmorsko višino pribl. 600 m) in Črni na Koroškem (Javorje z nadmorsko višino pribl. 1100 m).

Naše hipoteze so bile, da:

- bo kaljivost semen med posameznimi lokacijami primerljiva,
- se bo z nadmorsko višino spremenila koncentracija skupnih fenolov v semenih (predvidevamo, da bo naraščala) in
- se bo združba glivnih endofitov med posameznimi lokacijami razlikovala.

Material in metode

Naš poskus je potekal v časovnem razmiku treh tednov. V prvem tednu poskusa smo opravili kalitveni test in gojenje endofitnih gliv na gojišču PDA, v drugem tednu smo zrasle glive iz prvega tedna izolirali, jih morfotipizirali in na sveža gojišča PDA nacepili do čistih kultur. Hkrati smo tudi določili vsebnost skupnih fenolov v semenih. V tretjem tednu smo posamezne glivne morfotipe precepili na nova gojišča.

Kalitveni test

Za vsako lokacijo smo pripravili po pet petrijevk predhodno obloženih s filter papirjem in v vsako dali dvajset semen z iste lokacije ter jih dobro omočili z destilirano vodo. Kalitev semen smo spremljali prvi, tretji in sedmi dan od začetka testa.

Gojenje gliv na gojišču PDA

Od vsake lokacije smo vzeli dvajset semen ter jih pred nanosom na plošče površinsko sterilizirali na klasičen način (10 minut v 3% vodikovem peroksidu). Tako omočena semena smo nato prerezali na pol (da smo omogočili hitrejšo rast endofitov iz semen) ter jih sterilno prenesli na gojišče PDA.

Morfotipizacija gliv

V drugem tednu izvedbe poskusa smo preverili rast gliv ter jih razporedili v skupine glede na morfološke lastnosti. Pri tem smo si sami izbrali kategorije po katerih smo jih razvrstili v morfotipe. Glive smo razdelili v kategorije na osnovi barve, teksture in po obliki razrasti.

Izolacija gliv

Za nadaljnjo izolacijo posameznih morfotipov gliv smo nacepili po tri različne primerke na sveža gojišča PDA. V primeru, da za kakšen morfotip nismo imeli dovolj posameznih primerkov, smo na ploščo za izolacijo morfotipov nacepili večkrat isti primerek. V tretjem tednu poskusa smo zrasle glive iz vsake plošče ponovno nacepili na nove plošče z gojiščem PDA, da smo zagotovo dobili čiste kulture.

Določitev vsebnosti skupnih fenolov

Za določitev skupnih fenolnih snovi smo v tekočem dušiku strli 200 mg semen ajde. Temu smo dodali 10 ml 60 % EtOH in čez noč pustili na stresalniku. Skupne fenole smo določili z metodo po E. Kovačec in sod., 2016; prirejeno po I. Kreft in sod., 2013, kjer smo uporabili Folin-Ciocalteu-ov reagent in merili absorbanco pri 750 nm. Kot standard smo uporabili znane koncentracije katehola.

Statistična obdelava podatkov

Pridobljene podatke smo obdelali s programom Statistica 7.0, kjer smo izračunali povprečja, standardne odklone, standardne napake ter naredili enosmerno analizo varianc ANOVA z Duncanovim testom (razlike so statistično pomembne pri $p < 0,05$). Rezultate smo prikazali na grafih v programu Microsoft Excel.

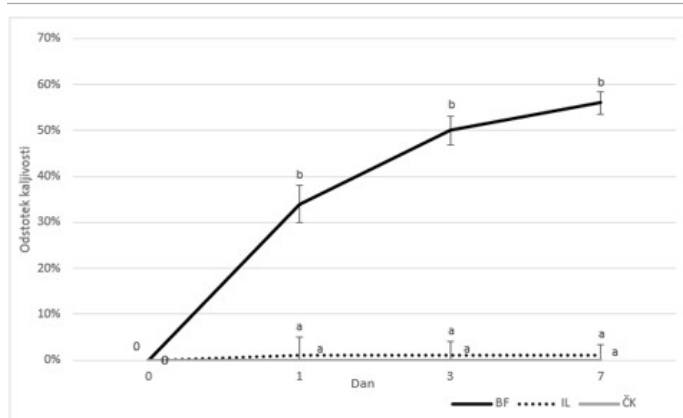
Rezultati

Kalitev

Slika 1 prikazuje kalitev semen navadne ajde iz treh različnih nadmorskih višin. Kaljivost semen gojenih na BF je 7. dan 70-odstotna, kaljivost semen IL in ČK pa 0-odstotna. Statistična obdelava (ANOVA) je pokazala, da razlika v kaljivosti semen 1., 3. In 7. dan med Ilirsko Bistrico in Črno na Koroškem ni statistično značilna, IL in ČK spadata v skupino a. Statistično značilna je razlika v kaljivosti semen iz Biotehniške fakultete, ta spada v skupino b.

Skupni fenoli

Slika 2 prikazuje povprečno vsebnost skupnih fenolnih snovi glede na suho težo semen navadne ajde (v odstotkih) iz lokacij BF, IL in ČK. Statistična obdelava (ANOVA) je pokazala, da razlika v vsebnosti fenolov semen med Ilirsko Bistrico (0,15-odstotna in Črno na Koroškem (0,14-odstotna) ni



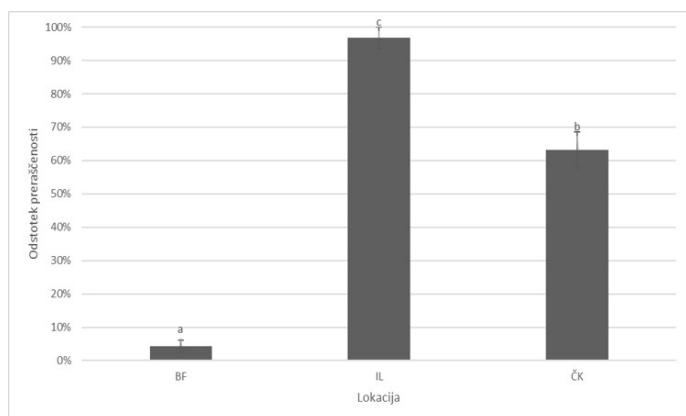
Slika 1: Kalitev semen (v odstotkih) navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) v odvisnosti od lokacije (povprečje \pm standardna napaka, $n=5$). Različne črke nad stolpci (a in b) prikazujejo statistično značilne razlike med semeni različnih lokacij (enosmerna ANOVA, Duncan post-hoc test, $p<0,05$). BF- Biotehniška fakulteta, IL - Ilirska Bistrica, ČK- Črna na Koroškem.

statistično značilna. Statistično značilna je razlika v vsebnosti fenolov v semenih navadne ajde iz Biotehniške fakultete (0,55-odstotna), zato spada v skupino b, v primerjavi z vsebnostjo fenola semen iz lokacij IL in ČK, kateri spadata v skupino a.

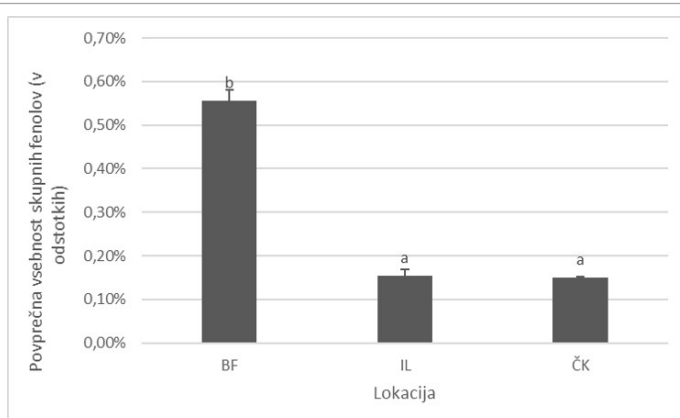
Endofiti

Iz slike 3 je razvidno, da so razlike stopenj rasti med vsemi tremi lokacijami statistično značilne. Daleč najmanjšo stopnjo rasti smo opazili pri lokaciji BF, povprečna stopnja rasti namreč ni bila več kot 5-odstotna. Sledi ČK, ki je sicer lokacija z najvišjo nadmorsko višino s približno 60-odstotno stopnjo rasti. Največjo stopnjo rasti smo opazili pri lokaciji IL s povprečno več kot 95-odstotno preraščenostjo gojišč.

Iz slike 4 je razvidno, da se diverziteteta gliv med lokacijami precej razlikuje. Največje število različnih morfotipov smo zabeležili pri lokaciji ČK z devetimi različnimi morfotipi. Sledijo vzorci iz lokacije BF s štirimi morfotipi. Najmanjšo diverziteteto smo opazili pri glivnih vzorcih iz lokacije IL, kjer smo našli

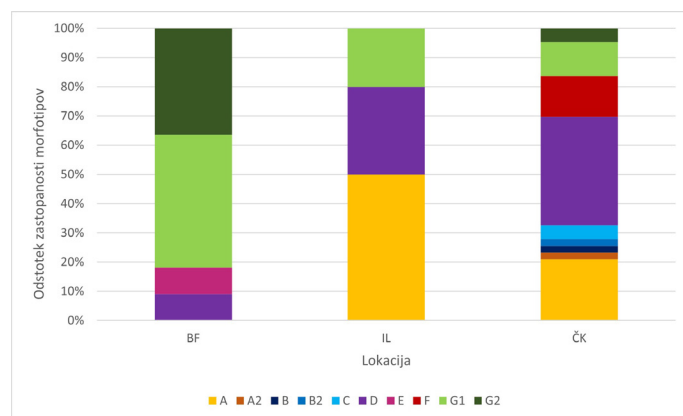


Slika 3: Stopnja rasti glivnih endofitov semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) na posameznih lokacijah (povprečje \pm standardna napaka, $n = 20$). Črke a, b in c predstavljajo statistično značilne razlike med različnimi lokacijami (enosmerna ANOVA, Duncanov test, $p<0,05$). BF - Biotehniška Fakulteta, IL - Ilirska Bistrica, ČK - Črna na Koroškem.



Slika 2: Povprečna vsebnost skupnih fenolov (v odstotkih) glede na suho težo semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) (povprečje \pm standardna napaka, $n=3$). Različne črke nad stolpci (a in b) prikazujejo statistično značilne razlike med semeni različnih lokacij (enosmerna ANOVA, Duncan post-hoc test, $p<0,05$). BF- Biotehniška fakulteta, IL - Ilirska Bistrica, ČK- Črna na Koroškem.

tri različne morfotipe. Po preceppljanju endofitov smo na gojiščih opazili pojavnost večih morfotipov, ki so se med seboj razlikovali po več lastnostih. Na lokaciji, kjer smo našli najmanj različnih morfotipov - IL, je prevladoval morfotip A, ki je zrasel na vseh ploščah, sledita mu še D in G1. Na lokaciji BF, ki edina ni imela zabeleženih rasti na vseh ploščah, smo zabeležili en morfotip več. Na največ ploščah iz te lokacije sta zrastle morfotipa G1 in G2, zasledili smo tudi morfotipa D in E, ki sta samostojno zrastle vsak na le eni plošči. Na ploščah lokacije, kjer smo zabeležili največjo glivno diverziteteto - ČK, je bilo največ morfotipa D, sledijo A, G1, F, G2, C ter še posamezni primerki A2, B in B2. Vsem lokacijam je torej skupna predvsem rast morfotipov G1 in D. Na lokacijah ČK in IL je bila rast mnogo bujnejša, kakor na lokaciji BF. Glede na slikovni določevalni ključ predvidevamo, da posamezni morfotipi sodijo v sledeče rodove oz. pripadajo določeni vrsti/kompleksu vrst: morfotip A - *Botrytis* (*B. cinerea*), A2 - *Rhizopus* (*R. oryzae*), B, B2 in C - *Epicoccum* (*E. nigrum*), D - *Alternaria* (*A. infectoria*), E - *Didymella* (*Didymella* sp.), G1 - *Hannaella* (*H. zae*) ter



Slika 4: Diagram diverziteteta glivnih endofitov semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) po lokacijah. Posamezna barva prikazuje določen morfotip, odtenki iste barve prikazujejo po internem ključu določene filogenetsko sorodne organizme. BF - Biotehniška fakulteta, IL - Ilirska Bistrica, ČK - Črna na Koroškem.

G2 - *Rhodotorula* (*Rhodotorula* sp. – verjetno *R. babjevae*). Morfotipa A in A2 sta se glede na ključ izkazala za pripadnika različnih rodov, označena sta z rumeno oz. oranžno barvo. Morfotipa B in B2 lahko glede na morfologijo tudi pripišemo vrsti *Epicoccum nigrum* (kot morfotip C), saj je zanj značilna visoka fenotipska plastičnost, ti trije morfotipi so označeni z različnimi odtenki modre. Morfotipa D in E sta morfološko zaradi črne obarvanosti podobna, vendar pripadata različnim rodovoma, označena sta s temno oz. svetlo vijolično. Morfotipa G1 in G2 glede na morfologijo in slikovni ključ pripadata različnim rodovoma kvasovk, označena sta s svetlo oz. temno zeleno. Morfotipa F označenega z rdečo barvo, na osnovi našega določevalnega ključa nismo mogli zanesljivo določiti. Predvidevamo, da sta na ploščah skupaj zrasli dve različni vrsti, ki smo ju pojmovali kot en morfotip.

Diskusija

Nadmorska višina je eden izmed mnogih dejavnikov, ki vplivajo na rast rastlin. V naši raziskavi smo pričakovali spremembe v stopnji kaljivosti, količini skupnih fenolov in glivnih endofitov semen v odvisnosti od nadmorske višine. Pri dobljenih rezultatih je prišlo do odstopanj od pričakovanih, saj smo zaradi slabe letine na lokaciji BF uporabili leto starejša semena. To se je pokazalo kot odstopanje od pričakovanih rezultatov pri določitvi stopnje kaljivosti, deleža suhe mase skupnih fenolov in glivne združbe v semenih navadne ajde. Največja kaljivost na lokaciji BF je verjetno zaradi starosti, saj imajo semena po enoletni dormanci večjo stopnjo kaljivosti (Jevdjovic in Maletic, 2003), namreč za semena rastlin zmernega podobnega pasu, kamor spada tudi navadna ajda, je značilno, da kalijo šele po določenem obdobju dormance. Česar mi nismo izvedli, vendar bi bilo v bodočih študijah smiselno vplesti, je povezava med velikostjo semen in stopnjo kaljivosti, saj naj bi večja semena bolje kalila (Jevdjovic in Maletic, 2003).

Naša hipoteza, da vsebnost skupnih fenolnih snovi z nadmorsko višino narašča, kot trdijo tudi Zhang in Bjorn (2009), od pričakovanj odstopa. Rezultati kažejo, da imajo najvišjo vsebnost skupnih fenolov, glede na suho težo, semena gojena na BF z najnižjo nadmorsko višino, semena iz višjih lokacij IL in ČK pa najnižjo vsebnost skupnih fenolov, katerih vsebnosti se ne glede na nadmorsko višino med sabo statistično ne razlikujeta. Do tega je verjetno prišlo zaradi starosti semen, ki so v enoletnem obdobju hranjenja izgubile delež vode, kar se je potem kazalo v večjem deležu skupnih fenolov, saj so se vodotopne snovi (med njimi tudi fenoli) v semenih zgostile. Poleg tega je lahko na vse to vplivala tudi mikroklima, saj je po Kishore in sod. (2010) poleg same nadmorske višine pomembno tudi, kakšno je lokalno vreme oz. čas sončnih dni in temperatura. Glede na ARSO, se je o številu sončnih dni v letu težko opredeliti, saj meteorološke postaje na žalost niso postavljene dovolj blizu našim lokacijam, da bi se nanje lahko zanesli - tiste, ki so najbližje našim lokacijam pa ne kažejo velikih nihanj v številu sončnih dni in temperaturi. Možna razlaga o odstopanju rezultatov od pričakovanega je lahko tudi v tem, da izbrane nadmorske višine preprosto niso dovolj različne. Mnoge druge podobne študije, kjer so preverjali razlike v vsebnosti fenolnih snovi semen, sicer tatarske ajde, so bile izvedene na nadmorskih višinah z več tisoč metri razlike (Kishore in sod., 2010; Guo in sod. 2011). Stopnja UV-B sevanja naj bi se bolj občutno spremenila na vsakih tisoč metrov nadmorske višine (Kishore in sod., 2010),

česar mi v naši raziskavi nismo presegli.

Sama uporaba že omenjenih lanskoletnih semen za lokacijo BF se je poznala tudi pri analizi endofitnih gliv, saj se s časom shrambe stopnja rasti gliv manjša (Kovačec in sod., 2016). Po drugi strani, naj bi se diverziteti gliv z višanjem nadmorske višine manjšala, kar so dokazali Yuan in sod. (2018) na glivah listov tobaka, vendar naši rezultati tega ne kažejo. Kovačec in sod. (2016) so v raziskavi na semenih navadne in tatarske ajde ugotovili, da večina izoliranih gliv pripada vrstam *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. in *Epicoccum* sp., katere smo glede na določitev s slikovnim določevalnim ključem določili tudi na naših ploščah. Na lokaciji IL sta dva od treh zraslih rodov pripadla ravno *Botrytis* (morfotip A) in *Alternaria* (morfotip D), ki sta visoko zastopana, s kar 80 odstotki. Na lokaciji ČK smo poleg *Botrytis* in *Alternaria* opazili tudi *Epicoccum* (morfotipi B, B2 in C), ki so med vsemi zraslimi rodovi zastopani več kot 60-odstotno. Na lokaciji BF opazimo *Alternaria* sp., vendar le s približno 10-odstotno zastopano, kar sovpada z literaturo, ki opisuje vpliv skladiščenja na pojavnost vseh treh omenjenih rodov (Kovačec in sod., 2016). Velika ovira pri tem delu naše raziskave je dejstvo, da je določitev gliv potekala samo preko njihove morfologije in uporabe internega ključa, katerega pa z literaturo ne moremo primerjati. Natančne podatke o dejanski vrstni pestrosti bi bilo zato potrebno pridobiti iz molekularnih analiz glivnih vzorcev.

Zaključki

Kaljivost se je med lokacijami sicer razlikovala, vendar na korelacijo z nadmorsko višino ne moremo sklepati, saj smo za študijo uporabili različno stara semena. Isti problem se je pojavil tudi pri določanju skupnih fenolov, kjer je bila koncentracija slednjih veliko večja na najnižji lokaciji, kot na ostalih dveh, ki sta bili višji. Torej je tudi pri tem testu na kakršnokoli povezavo z nadmorsko višino nesmiselno trditi. Glive med lokacijami se razlikujejo, tako po stopnji preraščenosti plošč, kot tudi po diverziteti morfotipov. Kljub temu je, zaradi uporabe različno starih semen in določevanja gliv samo na podlagi njihove morfologije, na vpliv nadmorske višine na prisotnost in pestrost glivnih endofitov težko sklepati.

Literatura

1. Faeth, S. H., in Fagan, W. F. (2002). Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology*, 42(2): 360–368.
2. Gimenez-Bastida, J. A., in Zielinski, H. (2015). Buckwheat as a functional food and its effects on health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(36): 7896–7913.
3. Guo, Xu Dan et al. 2011. Phenolics Content and Antioxidant Activity of Tartary Buckwheat from Different Locations. *Molecules* 16(12): 9850–67.
4. Jing, R., Li, H. Q., Hu, C. L., Jiang, Y. P., Qin, L. P., in Zheng, C. J. (2016). Phytochemical and pharmacological profiles of three *Fagopyrum* buckweats. *International journal of molecular sciences*, 17(4): 589.
5. Jevdjovic, Radosav, and Radojka Maletic. 2003. Effect of Buckwheat Seed Storage Duration on Its Quality. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade* 48(2): 135–41.
6. Kishore, Garima, Shashi Ranjan, Anjana Pandey, and Sanjay Gupta. 2010. Influence of Altitudinal Variation on the Antioxidant Potential of Tartar Buckwheat of Western Himalaya. *Food Science and Biotechnology* 19(5): 1355–63.
7. 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.
8. Kreft, M. (2016). Buckwheat phenolic metabolites in health and disease. *Nutrition research reviews*, 29(1): 30-39.
9. Yuan, Xiao Long et al. 2018. Composition and Genetic Diversity of the *Nicotiana Tabacum* Microbiome in Different Topographic Areas and Growth Periods. *International Journal of Molecular Sciences* 19(11).
10. Zhang W. J., Bjorn L. O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80: 207–218.

Vpliv nadmorske višine na glivno združbo semen tatarske ajde

Saša Kupčič, Primož Mihelič, Eva Reberšek, Dragana Radivojevič

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

- Opazovali smo vpliv nadmorske višine na frekvenco prisotnih glivnih endofitov ter vsebnost fenolnih spojin v semenih tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). Ta vrsta izvira s področij z večjo nadmorsko višino in je zaradi višje vsebnosti antioksidativnih snovi bolj odporna na širši spekter okoljskih dejavnikov kot navadna ajda.
- Semena smo po predhodni površinski sterilizaciji prerezali na pol in prenesli na PDA (potato dextrose agar) gojišča. Zrasle glive smo izolirali in jih določili na podlagi morfoloških lastnosti, kot so: oblika rasti, barva, površina.
- Vsebnost fenolnih spojin smo določili tako, da smo spojine sprva ekstrahirali in nato spektrofotometrično določili absorbanco posameznih vzorcev.
- Frekvenca vzkaljenih semen pri lokaciji z največjo nadmorsko višino je bila veliko večja kot pri ostalih. Na tej lokaciji imajo semena tudi večjo diverziteteto glivnih endofitov.

Ključne besede: tatarska ajda, nadmorska višina, glivni endofiti, fenolne spojine

Uvod

Nadmorska višina vpliva na številne morfološke in fiziološke lastnosti rastlin. Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) je zaradi višje vsebnosti antioksidativnih snovi bolj odporna na neugodne okoljske dejavnike kot navadna ajda. Razlog temu je, da tatarska za razliko od navadne ajde izvira s področij z večjo nadmorsko višino, na katerih je sevanje UV-B bolj intenzivno. Rastline so razvile različne mehanizme za popravilo in zaščito pred UV-B sevanjem. Obe vrsti, tako tatarska kot navadna ajda, sintetizirata UV absorbirajoče spojine, kot so kampferol, luteolin, rutin, triclin in apigenin, ki absorbirajo sevanje v območju od 280–400 nm (Breznik in sod., 2005).

Dokazano je bilo, da v semenih ajde najdemo okoli 30 vrst različnih glivnih endofitov iz 22 različnih rodov (Kovačec in sod., 2016). Ni pa še znano, ali je glivna vrstna raznolikost na semenih tatarske ajde odvisna od nadmorske višine. Ugotavljali smo, ali se številčnost in struktura glivnih endofitov v semenih tatarske ajde spreminja v odvisnosti od različne nadmorske višine.

Preverili smo tudi, ali se semena vzgojena na različnih nadmorskih višinah razlikujejo v sposobnosti kalitve. Tatarsko ajdo se pogosto goji na večjih nadmorskih višinah, kjer je močno UV sevanje in okolje ni primerno za riž ali druge večje pridelke. Rastline, izpostavljene povišanemu sevanju UV-B, pogosto kažejo zmanjšano rast kot posledico induciranih morfoloških sprememb (Regvar in sod., 2012). Prav tako tatarska ajda pri večji nadmorski višini proizvede več flavonoidov, ki vplivajo na rast mikoriznih gliv (Regvar in sod., 2012). Zanimala nas je koncentracija skupnih fenolov v semenih.

Hipoteze:

- Semena tatarske ajde z večjih nadmorskih višin bodo imela večjo stopnjo kalitve.
- V semenih tatarske ajde z večjih nadmorskih višin bo diverziteteta prisotnih glivnih endofitov večja.
- V semenih tatarske ajde z večjih nadmorskih višin bo višja vsebnost skupnih fenolov.

Material in metode

Ajdo smo sejali na 3 različnih lokacijah, ki se nahajajo na različnih nadmorskih višinah: na poljih Biotehniške fakultete (cca. 300 m n.m.v.), Podbeže v okolici Ilirske Bistrice (cca. 600 m nmv) in v Javorjah v bližini Črne na Koroškem (cca. 1100 m nmv).

Kalitveni test

V 5 petrijevk smo dali po 20 zrelih semen tatarske ajde. Tako je bila velikost vzorca za posamezno lokacijo skupaj $n = 100$ semen. Kalitev smo spremljali 1 teden. Prvi, tretji in sedmi dan smo prešteli semena, ki so vzkalila.

Določanje diverzitetete gliv

Za spremljanje vpliva na glivno rast je bilo treba semena na začetku površinsko sterilizirati. Dodali smo jih v čašo s 3% H_2O_2 in jih namakali 10 minut. Po sterilizaciji smo posamezno seme prerezali na pol, eno polovico semena položili na sredino PDA gojišča, tako da je bila prerezana površina v stiku s podlago ter ploščo zatesnili z živilsko folijo. Delo je potekalo v laminariju v sterilnih pogojih. Za posamezno lokacijo smo uporabili 20

semen (20 plošč), skupaj torej: 20 plošč x 3 lokacije = 60 plošč. Glive smo po enem tednu morfotipizirali glede na njihove morfološke lastnosti, kot so: oblika rasti, barva, površina ipd.

Določanje fenolnih snovi

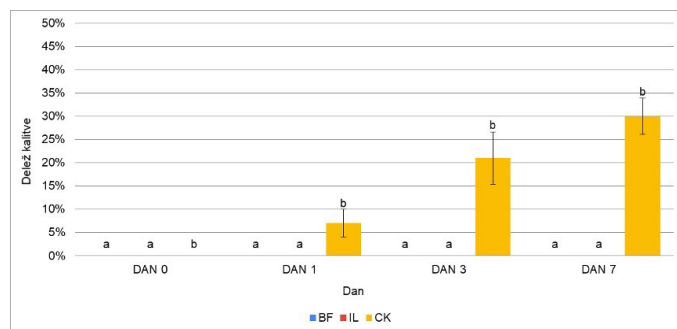
Vsebnost skupnih fenolov v semenih tatarske ajde smo določili spektrofotometrično z uporabo Folin–Ciocalteu (FC) reagenta. Najprej smo pripravili standarde iz založne raztopine katehola (1 g/L v dH_2O). Koncentracije (mg/mL) so bile 0.5, 0.25, 0.125, 0.05 in 0.01. Po 100 μ L tako pripravljenih standardov smo odpipetirali v nove mikrocentrifugirke in dodali 750 μ L dH_2O ter 50 μ L FC reagenta. Po treh minutah smo vsakemu vzorcu dodali še 100 μ L 20 % Na_2CO_3 . Po 60-minutni inkubaciji v temi smo izmerili absorbanco pri 750 nm in tako dobili umeritveno premico. Semena smo strli v tekočem dušiku ter 200 mg materiala razdelili v 4 mikrocentrifugirke (po 50 mg v vsako). Vsaki smo nato dodali 2 mL 60 % EtOH. Tako pripravljene vzorce smo čez noč pustili na stresalniku in tako ekstrahirali fenolne spojine. Po 100 μ L ekstraktov semen iz posameznih rastišč smo odpipetirali v 5 mikrocentrifugirk (za vsako rastišče 5 paralelk). Dvema smo dodali le 800 μ L dH_2O (slepa proba), trem pa 750 μ L dH_2O in 50 μ L FC reagenta. Po treh minutah smo vsem dodali še 100 μ L 20 % Na_2CO_3 , vse skupaj 60 minut inkubirali v temi in izmerili absorbanco pri 750 nm (Kovačec in sod., 2016). Koncentracijo skupnih fenolnih snovi v vzorcu smo določili s pomočjo umeritvene premice standarda. Dobljeno koncentracijo skupnih fenolov v mg/mL smo preračunali v delež glede na suho maso semen. Povprečje in standardna deviacija sta bila izračunana in prikazana s stolpičnim diagramom.

Rezultate iz različnih rastišč smo med seboj primerjali z uporabo enosmerne analize variance (ANOVA) ($p < 0,05$) v programu Statistica.

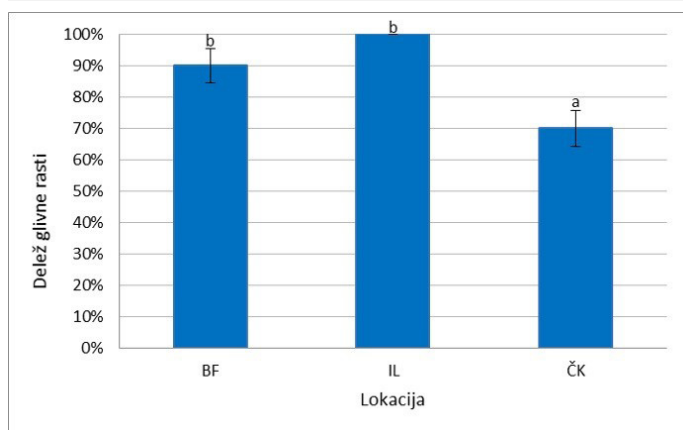
Rezultati

Kalitve

Kalitveni test je pokazal, da pri semenih z lokacije Biotehniška fakulteta (cca. 300 m nmv) ter Ilirska Bistrica (cca. 600 m nmv) v času opazovanja ni prišlo do kalitve. Pri lokaciji Črna na Koroškem (cca. 1000 m nmv) je prvi dan opazovanja vzkalilo 7 semen, tretji dan 21 in sedmi dan 30 semen od skupno 100. Rezultati so prikazani v Sliki 1. Stopnja kalitve pri semenih iz



Slika 1: Delež kalitve za posamezno lokacijo. $N=5$, prikazana so povprečja \pm SN. Različne črke (a, b) označujejo statistično značilno razliko Holm–Sidak post hoc testa pri $p < 0,05$. BF – Biotehniška fakulteta, IL – Podbeže pri Ilirski Bistrici, ČK – Javorje v bližini Črne na Koroškem.



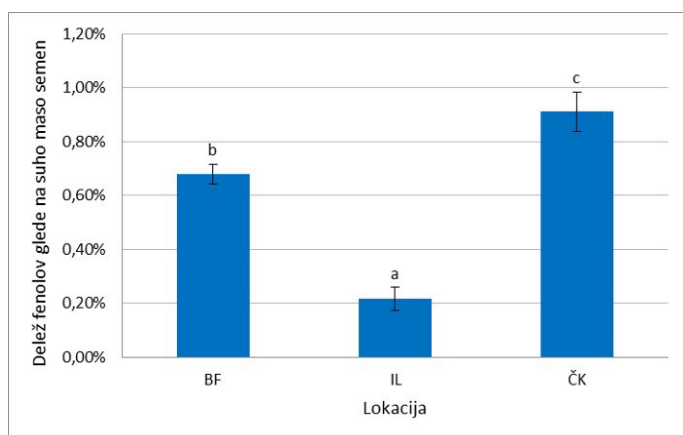
Slika 2: Rast gliv za posamezno lokacijo. N=15, prikazana so povprečja \pm SN. Različne črke (a, b) označujejo statistično značilno razliko Holm-Sidak post hoc testa pri $p < 0,05$. BF – Biotehniška fakulteta, IL – Podbeže pri Ilirski Bistrici, ČK – Javorje v bližini Črne na Koroškem. Pri vsaki plošči je bila izmerjena stopnja rasti (od 0 cm do 7 cm) in nato glede na stopnjo rasti izračunan delež rasti.

lokacije Črna na Koroškem se statistično značilno razlikujejo od rezultatov z ostalih dveh lokacij.

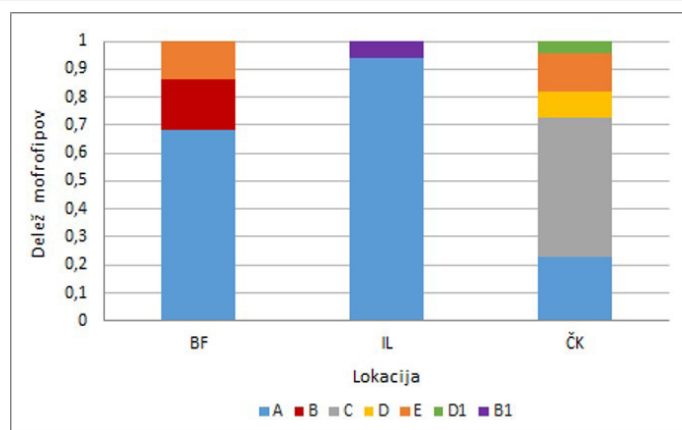
Diverziteteta gliv

Z morfološko preiskavo izolatov, ki je vključevala opis barve, roba, oblike in površine glive, smo opisali sedem različnih glivnih morfortipov. V prilogi (Seznam gliv) so prikazani morfortipi: A, B, C, D, D1, E, in B1. S pomočjo določevalnega ključa smo uvrstili prej določene morfortipe v štiri biološke vrste: *Botrytis cinerea* (morfortip A), *Didymella* sp. (morfortipi: B in C), *Epicoccum* sp. (morfortipi: B1, D in D1) in *Alternaria* sp. (morfortip E).

Plošče, na katerih so bila semena ajde s polj Biotehniške fakultete, so imele povprečen delež razraščeniosti 0,9. S Slike 3 je razvidno, da na teh lokacijah prevladuje glivni morfortip A. Poleg morfortipa A sta na ploščah zrastle še morfortipa B in E. Na treh ploščah smo opazili kombinacijo dveh morfortipov (kombinacija A, B in A, E), na dveh ploščah pa kombinacijo treh morfortipov (kombinacija A, B, E). Plošče, na katerih so bila



Slika 4: Delež skupnih fenolov glede na suho maso semen tatarske ajde. N=3, prikazana so povprečja \pm SN. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilno razliko Holm-Sidak post hoc testa pri $p < 0,05$. BF – Biotehniška fakulteta, IL – Podbeže pri Ilirski Bistrici, ČK – Javorje v bližini Črne na Koroškem.



Slika 3: Diverziteteta morfortipov po lokacijah prikazuje, kateri morfortipi in v kakšni meri so prisotni na posamezni lokaciji. BF – Biotehniška fakulteta, IL – Podbeže pri Ilirski Bistrici, ČK – Javorje v bližini Črne na Koroškem. Morfortipi: A, B, C, D, E, D1, B1. Za vsako lokacijo je bilo analiziranih 15 plošč. Pri vsaki plošči je bilo določeno število morfortipov gliv, za vsak morfortip je bil določen delež glede na skupno število vseh morfortipov na tej lokaciji.

semena ajde iz okolice Ilirske Bistrice, so imele maksimalen delež razraščeniosti med vsemi tremi ploščami (Slika 2). Hkrati so imele najmanjšo diverziteteto – spet prevladuje morfortip A, v veliko manjši meri je prisoten še morfortip B1, slednji se pojavlja le v enem vzorcu (Slika 3). Plošče, na katerih so bila semena ajde iz Javorja v bližini Črne na Koroškem, so imele najnižji delež razraščeniosti in največjo variacijo razraščeniosti med ploščami (Slika 2). Po drugi strani smo tukaj opazili največjo pestrost – prisotnih je bilo 5 morfortipov. Prevladoval je morfortip C, prisoten je na 14 ploščah (Slika 3). Opazili smo različne kombinacije morfortipov: C in D, C in E, C in A, D1 in E.

Fenolne snovi

Na lokaciji Črna na Koroškem je bila povprečna vrednost deleža skupnih fenolov glede na suho maso semen najvišja in sicer 0,9107 %. Sledi lokacija Biotehniška fakulteta z deležem fenolov 0,6787 %. Najmanjši delež skupnih fenolov smo določili v semenih z lokacije Ilirska Bistrica, to je 0,2175 % suhe mase semen. Vsebnosti skupnih fenolov z vseh treh lokacij se statistično značilno razlikujejo, kar je razvidno s Slike 5.

Diskusija

Divja tatarska ajda raste na področju gorate planote Tibeta in v Himalaji. Na področju Himalajske regije ter v južnem delu Kitajske je pomembna poljščina, ki predstavlja eno izmed ključnih živil za tamkajšnje prebivalce (Onishi, 2000). Na podlagi tega smo pričakovali, da bodo imela semena iz lokacij z večjo nadmorsko višino višjo frekvenco kalitve, saj je tatarska ajda adaptirana na vremenske pogoje, ki vladajo na takšnih višinah. Kalitveni test je pokazal, da je bila frekvenca kalitve višja pri semenih z lokacije Črna na Koroškem s 1000 metri nadmorske višine, pri semenih ostalih dveh lokacij do kalitve sploh ni prišlo. Ni pa nujno, da je razlog, da semena z drugih dveh lokacij niso kalila, le nadmorska višina rastišča. Upoštevati moramo dejstvo, da so semena iz leta 2020 in niso šla skozi obdobje dormance. Rezultati bi bili bolj reprezentativni, če bi semena nekaj mesecev počivala in šele takrat bi lahko zanesljivo trdili, da je glavni razlog za nizko kalitev nadmorska

višina.

Na podlagi naših rezultatov, pridobljenih s treh lokacij na različnih nadmorskih višinah, lahko sklepamo, da se s povečanjem nadmorske višine diverziteta glivnih združb lahko poveča ali zmanjša in da različni morfotipi prevladujejo pri različnih nadmorskih višinah. Do podobnih rezultatov so prišli tudi pri raziskavi podzemnih glivnih združb gozdov na treh različnih nadmorskih višinah, kjer je izpostavljen pomen okoljskih dejavnikov za mikrobo sestavo in raznolikost. Te se spreminjajo neposredno z okoljskimi dejavniki, kot so: razpoložljivost hranil, vsebnost vode v tleh, vlažnost, pH, temperatura (Han Meng in sod., 2012). Večja diverziteta na prvi in tretji lokaciji je lahko posledica podobnih vremenskih pogojev. Če si pogledamo povprečne temperature, variacijo v temperaturi in povprečno količino padavin, je razvidno, da se Ilirska Bistrica razlikuje od okolice Biotehniške fakultete in Javorjev v bližini Črne na Koroškem. Morfotip A je edini morfotip, ki zelo dobro uspeva v teh bolj ekstremnih pogojih. Prav tako je edini morfotip, ki je prisoten na vseh treh lokacijah. Vendar pa obstaja razlika v deležu morfotipa A v celotni glivni združbi. Bistveno večja diverziteta na tretji lokaciji lahko predstavlja težavo za rast glive morfotipa A. Sklepamo lahko, da gre tukaj za kompeticijo med različnimi morfotipi v isti ekološki niši. Določene vrste so bolj prilagodljive in imajo širši razpon pogojev, kjer lahko zrastejo, druge pa so prilagodljive manj. Pri določenih pogojih imajo določene vrste prednost (Schon in sod., 2018). Ko govorimo o okužbi semen tatarske ajde s patogenimi glivami, je pomembno izpostaviti vlažnost kot najpomembnejši dejavnik. Kovačec s sod. (2016) ugotavlja, da je rast *B. cinerea* povečana na račun zatiranja rasti *Alternaria* sp. Podoben trend lahko opazimo v naši raziskavi. Bolj suha klima na prvi lokaciji prispeva k večji rasti *B. cinerea*, kar pa ima za posledico manjšo rast ostalih rodov, saj jim *B. cinerea* ne omogoča razraščanja. Z večanjem nadmorske višine narašča tudi intenziteta UV-B sevanja in s tem koncentracija fenolnih snovi v ajdi (Kreft s sod., 2002). Umek s sod. (1999) ugotavlja, da obstaja neposredna korelacija med nadmorsko višino rastišča in koncentracijo rutina (najbolj zastopan polifenol) v šentjanževki (*Hypericum perforatum*). V naši raziskavi smo ugotovili, da je v semenih z najvišje ležečega rastišča (Črna na Koroškem, 1100 m nmv) delež skupnih fenolov res največji (0,9107 % suhe mase semen). Glede na hipotezo bi morala po vsebnosti fenolov slediti semena iz Ilirske Bistrice (600 m nmv) in nazadnje semena iz okolice Biotehniške fakultete (300 m nmv). Iz rezultatov vidimo, da temu ni tako, saj imajo semena iz Ilirske Bistrice najmanjšo koncentracijo fenolnih snovi (0,2175 % glede na suho maso). Nadmorska višina rasti očitno ni največji dejavnik pri sintezi fenolnih snovi v semenih. Predpostavimo lahko, da je imela znaten vpliv tudi mikroklima na posameznih lokacijah. Naše hipoteze torej ne moremo v celoti potrditi.

Zaključki

- Rezultati naše raziskave kažejo, da imajo semena tatarske ajde z večjih nadmorskih višin višjo stopnjo kalitve kot tista z manjših, kjer do kalitve sploh ni prišlo, a je lahko razlog za nizko kalitev to, da semena pred kalitvenim testom niso imela obdobja dormance.
- V semenih z večjih nadmorskih višin je diverziteta glivnih endofitov največja, kar potrjuje našo hipotezo.
- Prav tako smo pravilno napovedali, da bo v teh semenih prisotnih največ fenolnih snovi, vendar pa se to ni izkazalo kot trend tudi na primeru drugih dveh lokacij.

Literatura

1. Breznik B, Germ M, Gaberscik A, & Kreft I, 2005. Combined effects of elevated UV-B radiation and the addition of selenium on common (*Fagopyrum esculentum* Moench) and tartary [*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.] buckwheat. *Photosynthetica* 43(4), 583–589. doi:10.1007/s11099-005-0091-1
2. Fabjan N, Rode J, Košir IJ, Wang Z, Zhang Z, & Kreft I, 2003. Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a Source of Dietary Rutin and Quercitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(22), 6452–6455. doi:10.1021/jf034543e
3. Han Meng, Ke Li, Ming Nie, Jia-Rong Wan, Zhe-Xue Quan, Chang-Ming Fang, Jia-Kuan Chen, Ji-Dong Gu, Bo Li, 2012. Responses of bacterial and fungal communities to an elevation gradient in a subtropical montane forest of China. *Environmental Biotechnology*
4. Kovačec E, Likar M, Regvar M, 2016. Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. *Fungal Biology*
5. Kovačec E, Regvar M, Likar M, 2016. Endofitske glive iz semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) in njihove interakcije z bakrovimi spojinami. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 132 str.
6. Kreft S, Štrukelj B, Gaberščik A, Kreft I, 2002. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany* 53, 375: 1801–1804
7. Mravlje J, 2020. Teme in kratki opisi projektnih nalog pri predmetu rast in razvoj rastlin. E-pouk, Rast in razvoj rastlin
8. Ohnishi O, 2000. Geographical distribution of allozymes in natural populations of wild Tartary buckwheat. *Fagopyrum* 17, 29–34
9. 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
10. Schon ME, Nieselt K, Garnica S, 2018. Belowground fungal community diversity and composition associated with Norway spruce along an altitudinal gradient. *PLoS ONE* 13
11. Umek A, Kreft S, Kartnig T, Heydel B, 1999. Quantitative phytochemical analyses of six hypericum species growing in slovenia. *Planta Medica* 65(4), 388–390

Vpliv hladne plinske plazme na kalitev in glivno združbo semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench.)

Ela Praznik, Leja Perne, Tim Gorše, Viktoria Forte Berlec

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

- Obravnava bioloških materialov s hladno plinsko plazmo (HPP) je potencialna alternativna metoda za zmanjševanje okužb semen z bakterijami in glivami oziroma njihovo dekontaminacijo. V raziskavi smo semena navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) obdelali s HPP in preverili kako le-ta vpliva na kalitev in glivno združbo semen.
- Semenom navadne ajde, ki so bila različno dolgo (30, 60, 90, 120 s) izpostavljena HPP, smo določili stopnjo kaljivosti s kalitvenim testom, stopnjo glivne kolonizacije ter na osnovi morfoloških lastnosti določili vrstno sestavo glivnih združb.
- Dobljene rezultate smo primerjali z opažanji pri neobdelanih semenih (kontrola) in semenih obdelanih s 30% H₂O₂ (sterilna kontrola). Ugotovili smo, da obdelava semen s HPP postopno, v odvisnosti od časa izpostavitve, zmanjšuje delež kalečih semen. Zmanjšuje se tudi stopnja glivne kolonizacije ter delež in pojavnost morfotipov v glivnih združbah, a šele po 90 sekundni izpostavitvi. Najpogosteje izolirani rodovi so bili *Alternaria*, *Didymella* in *Epicoccum*.
- Na podlagi rezultatov menimo, da z izbranimi obdelavami nismo bili uspešni v iskanju optimalnega časa izpostavljenosti, ki bi zagotovil čim višjo stopnjo kaljivosti in hkrati temeljito dekontaminacijo semen

Ključne besede: dekontaminacija, hladna kisikova plazma, navadna ajda, kaljivost semen, glivna združba

Uvod

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*) je ena izmed najstarejših udomačenih poljščin, ki izvira iz Azije (Woo s sod. 2016). Je rastlina iz rodu *Fagopyrum*, iz družine dresnovk (*Polygonaceae*). Čeprav jo uvrščamo med psevdožita, je ta klasifikacija pravzaprav zmotna, saj rastlina ne odraža lastnosti trav (*Poaceae*) (Farooq s sod. 2016). Produkti iz semen in moke so zaradi hranljivosti in okusa priljubljeni v kulinariki širom sveta, semena pa se uporablja tudi za krmo ter, zaradi visokih vsebnosti flavonoida rutina, za zdravljenje srčno-žilnih bolezni v farmacevtski industriji in medicini (Campbell 1997).

Tekom skladiščenja so semena ajde pogosto kontaminirana s patogenimi bakterijami in glivami. Kljub vpeljavi številnih strategij za zmanjševanje rastlinskih bolezni te še vedno povzročajo 20-30 % izgubo pridelka letno (Adhikari s sod. 2020). Mikroorganizmi na površini semen, ki se uporabljajo nadalje za prehrano ali setev, tako predstavljajo znaten problem v živilski industriji in kmetijstvu. Poleg vpliva na kaljivost semen, površinski mikrobi pogosto proizvajajo različne toksine, ki lahko pri potrošniku povzročijo zastrupitev. Dekontaminacija semen in ustrezno skladiščenje je torej ključnega pomena za vzdrževanje kakovosti in preprečevanje ekonomskih izgub (Sivachandiran s sod. 2017). Čeprav so semena sorazmerno odporna, je dekontaminacija kakršnegakoli biološkega materiala, namenjenega za uživanje ali nadaljnje kaljenje, težavna: odstraniti želimo nezaželene kontaminante, hkrati pa želimo ohraniti seme nepoškodovano in užitno. Tradicionalne metode odstranjevanja patogenov, kot na primer kemične metode, postajajo nezaželene zaradi pojavljanja odpornosti mikrobov in onesnaževanja okolja, medtem ko genski inženiring v javnosti še vedno vzbuja pomisleke za vsesplošno uporabo (Adhikari s sod. 2020). Kot obetajoča alternativna metoda dekontaminacije se v zadnjem času vzpostavlja uporaba hladne plazme (Adhikari s sod. 2020, Sivachandiran s sod. 2017, Waskow s sod. 2018). Hladna plazma je ioniziran plin, ki ga ustvarimo z izpostavitvijo izbranega plina mikrovalovom, radijskim frekvencam, pulzirajočemu ali izmeničnemu električnemu toku. Ionizacija plina povzroči nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, reaktivnih dušikovih zvrsti, ionov, elektronov in UV sevanja. Ker hladno plazmo ustvarjamo pri nizki temperaturi oziroma ostanejo nastali delci na nizkih temperaturah, to naredi tovrstno plazmo primerno za obdelavo površin občutljivih bioloških materialov (Sivachandiran s sod. 2017). Sami mehanizmi delovanja plazme še niso popolnoma znani, številne raziskave pa so že pokazale uspešno dekontaminacijo tako semen kot tudi rastlin, ter in vitro kultur. Za razširitev uporabe plazme kot metode za dekontaminacijo je potrebna standardizacija metode, poleg tega pa je potrebnih več eksperimentov za ugotavljanje vitalnosti kalčkov in rastlin, ki zrastejo iz tako obdelanih semen (nekaj raziskav je pokazalo celo izboljšanje kaljivosti semen) (Adhikari s sod. 2020). V dani raziskavi nas je zanimal vpliv obdelave s hladno plazmo na kalitev in dekontaminacijo oz. glivno združbo semen navadne ajde.

Predpostavili smo naslednje hipoteze:

- Stopnja kaljivosti semen bo po obdelavi s hladno plazmo višja v primerjavi s kontrolo.
- Daljša kot bo časovna obdelava semen s hladno plazmo, manjše bo število morfotipov gliv.
- Daljša kot bo časovna obdelava semen s hladno plazmo, manjša bo stopnja glivne kolonizacije.

Materiali in metode

Obdelava semen s plazmo

Semena ajde, ki smo jih uporabili v raziskavi so nam predhodno obdelali na Inštitutu Jožef Stefan s hladno kisikovo plazmo. Pogoji, pri katerih je potekala obdelava: znižan tlak/vakuum – 50 Pa, radiofrekvenčni vir napetosti, moč - 200 W, izpostavitve: 0, 30, 60, 90, 120 sekund.

Kalitveni test

Po 20 semen iz vsake obdelave s plazmo (30, 60, 90, 120 s) kot tudi kontrolna semena (neobdelana s plazmo) smo v petih paralelkah prenesli na filtrirni papir, ki smo ga izrezali in položili v petrijevke, torej skupno 500 semen. Semena smo dobro namočili z destilirano vodo in jih prenesli v kartonaste škatle v rastno komoro v temo pod kontrolirane pogoje (temp. 22°C, vlaga: 60-70%, tema). Kaleča semena vseh paralelk pri posameznih izpostavitvah s plazmo smo prešteli po 1., 3. in 7. dnevu.

Izolacija gliv iz semen ajde

V laminariju smo semena navadne ajde, ki so bila predhodno obdelana s hladno kisikovo plazmo v različno dolgih izpostavitvah (30, 60, 90, 120 s), nacepili na glivna gojišča PDA (s krompirjevim dekstroznim ekstraktom). Poleg obdelanih semen smo uporabili tudi semena navadne ajde, ki niso bila izpostavljena obdelavi s plazmo, kar je bila naša pozitivna kontrola. Negativna kontrola pa so bila semena navadne ajde, ki smo jih predhodno namočili za 10 minut v 30% vodikov peroksid (klasična sterilizacija). V laminariju smo sterilno prenesli semena na glivna gojišča. Na posamezno petrijevko smo s pinceto položili individualna semena, za vsako izmed izpostavitvev smo naredili 15 paralelk, torej skupno 90 semen. Petrijevke smo zatesnili z ovijalno folijo za živila, jih ustrezno označili, ter zapakirali v kartonasto škatlo in jih prenesli v rastno komoro pod kontrolirane pogoje za en teden (temp. 20°C, tema). Po enotedenski kultivaciji gliv so iz semen na ploščah zrastle različne glive, ki smo jih morfotipizirali glede na njihove morfološke lastnosti, kot so barva iz zgornje in spodnje strani, oblika rasti in tekstura. Ocenili smo stopnjo kolonizacije ter na podlagi morfoloških značilnosti ocenili število gliv, ki so kolonizirale posamezno seme. Za oceno kolonizacije smo uporabili sedem-stopenjsko lestvico, ki je temeljila na ocenjenem premeru razrasti gliv na petrijevki od 0 cm (stopnja kolonizacije 0) do 7 cm (stopnja kolonizacije 7). Zabeležili smo si tudi število morfotipov, ki so se pojavljali na posamezni plošči. Po dva predstavnika istega morfotipa smo precepili naprej, vsakega na sveže gojišče PDA. Tako precepljene glive smo pod enakimi pogoji gojili še en teden. Zatem smo ponovno precepili vsak morfotip na novo PDA gojišče, da smo zagotovo dobili čiste kulture. Morfotipe gliv smo s pomočjo slikovnega določevalnega ključa določili do vrste ali rodu.

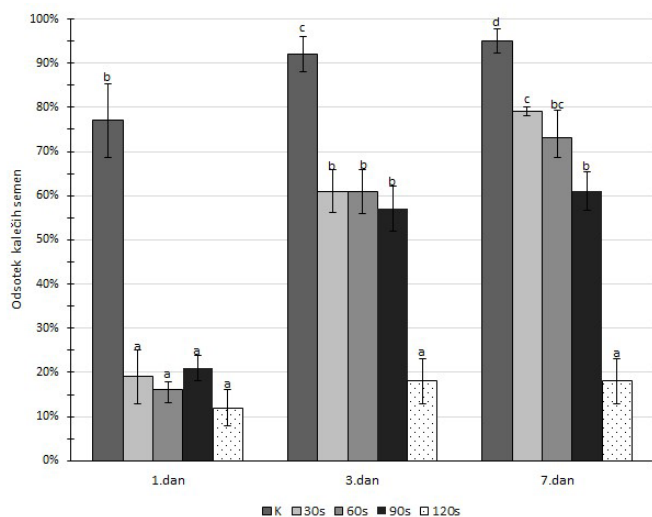
Statistična analiza

Podatke smo zbrali in uredili v programu Microsoft Excel in jih statistično obdelali v programu Statistica 12.5. Statistično značilne razlike med tretmaji smo določili z enosmerno analizo

variance (ANOVA) z uporabo post-hoc Duncanovega testa ($p < 0,05$).

Rezultati

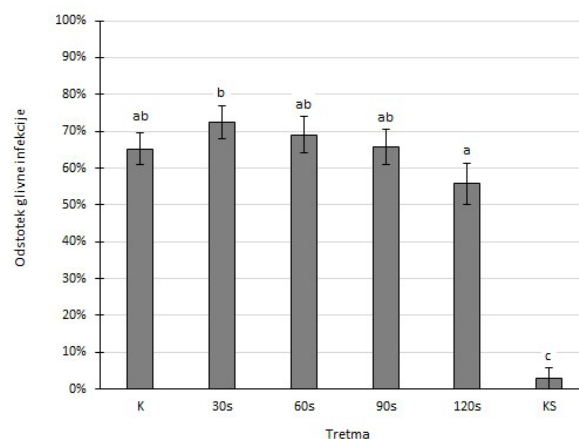
Pri kalitvenem testu smo preverjali, če dolžina izpostavitve semen hladni kisikovi plazmi vpliva na kalitev. V primerjavi z obdelavo semen s plazmo je opazna statistično značilna razlika deleža kalečih semen pri kontroli (K) pri vseh dnevih opazovanja (slika 1). Kontrolna skupina je v povprečju zadnji dan opazovanja dosegla kar 95% kalitev. Statistično značilna razlika med obdelavami s plazmo se pojavi tretji dan, in sicer med izpostavitvijo semen za 120 sekund in ostalimi časovnim izpostavitvami. Kalitev semen pri obdelavah 30, 60 in 90 sekund pa je skozi opazovani čas dokaj primerljiva. Razvidno je, da obdelava semen s plazmo bistveno vpliva na zmanjševanje deleža kalečih semen, čeprav se pri vseh obdelavah individualno delež kalečih semen vseeno povečuje s časom. Izjema je tretma 120 sekund, ki ne kaže bistvene razlike v deležu kalečih semen med tretjim in sedmim dnevom opazovanja tj. 18%.



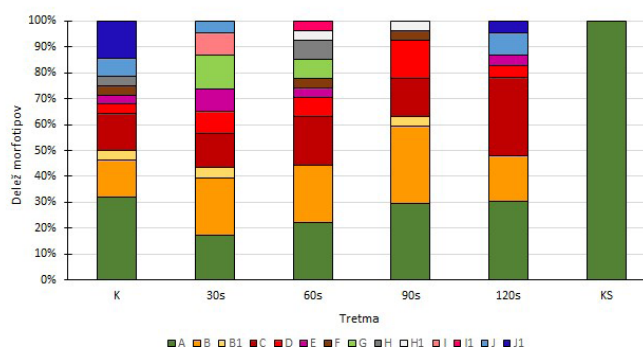
Slika 1: Graf prikazuje delež kalečih semen navadne ajde pri posamezni obdelavi (30, 60, 90, 120 s) pri posameznih dnevih opazovanja po izvedbi kalitvenega testa (1., 3., 7. dan). S črko K je označena kontrola (0 s). Prikazani podatki so standardizirane povprečne vrednosti števila kalečih semen po 20 semen ($SV \pm SE$, $n=5$). Statistično značilne razlike med tretmaji so prikazane kot skupine s črkami (a, b, c), določene z enosmerno analizo variance (ANOVA) z uporabo post-hoc Duncanovega testa pri $p < 0,05$.

Poleg kaljivosti semen smo preverili, če dolžina izpostavitve semen HPP vpliva na stopnjo glivne infekcije oziroma razrasti. Kot je iz grafa razvidno (slika 2), se povprečna stopnja glivne kolonizacije postopoma zmanjšuje s podaljševanjem časa obravnave, pri vseh obravnava s plazmo pa je dosegla vsaj 55%. Pri obravnavi KS je razvidna statistično značilna razlika v povprečni stopnji glivne kolonizacije v primerjavi z ostalimi tretmaji. Rezultati namreč kažejo, da je bila pri te obravnavi prisotna najmanjša stopnja glivne kolonizacije in sicer 7%. Obdelava s HPP se torej, v primerjavi s KS, ni izkazala za učinkovito metodo dekontaminacije.

V zadnjem koraku smo preverili, če dolžina izpostavitve semen HPP vpliva na sestavo glivne združbe. V eksperimentu smo izolirali 129 gliv, ki smo jih razvrstili v 15 morfortipov. Iz



Slika 2: Graf prikazuje povprečno stopnjo glivne kolonizacije oz. razrasti na gojiščih pri posameznih obravnava (30, 60, 90, 120 s). Prikazani podatki so standardizirane povprečne vrednosti premera glivne infekcije ($SV \pm SE$, $n=15$). Za vrednost 100% smo določili premer petrijevke, ki znaša 7 cm. S črko K je označena kontrola (0 s), s KS pa semena sterilizirana z 30% H_2O_2 . Statistično značilne razlike med tretmaji so prikazane kot skupine s črkami (a, b, c), določene z enosmerno analizo variance (ANOVA) z uporabo post-hoc Duncanovega testa pri $p < 0,05$.



Slika 3: Graf prikazuje delež posameznih izoliranih morfortipov na površini semen pri posameznih tretmaji (30, 60, 90, 120 s). S črko K je označena kontrola (0 s), s KS pa semena sterilizirana z 30% H_2O_2 .

rezultatov je razvidno, da se z daljšanjem časa izpostavitve semen spreminja predvsem delež in pojavnost morfortipov (slika 3). Število morfortipov začne upadati šele pri obravnavi 90 sekund (sedem), najmanjše število morfortipov se pojavi pri sterilni kontroli KS (eden), ki pa je bil najverjetneje posledica kontaminacije v laminariju. Naši rezultati kažejo na prisotnost devetih različnih rodov gliv in sicer *Alternaria* (A, G), *Didymella* (B, B1), *Epiccocum* (C, D), *Cladosporium* (E), *Penicillium* (F), *Phoma* (H1), *Botrytis* (I, I1), *Hannaella* (J) in *Rhodotorula* (J1), enega morfortipa pa nismo uspeli določiti na osnovi morfoloških lastnosti. Rodovi, ki so prevladovali in se pojavili pri vseh izpostavitvah (razen sterilni kontroli) so *Alternaria* (zeleno), *Didymella* (oranžno) in *Epiccocum* (rdeče), ki dosegajo najvišje deleže prisotnosti, tj. skupno 60% ali več pri določeni obravnavi. Vrsta *Botrytis cinerea* se je pojavila le pri izpostavitvah 30 in 60 sekund (rožnato), *Phoma herbarum* pa le pri 60 in 90 sekund (belo). V prilogah so slikovno prikazani in

določeni morfotipi gliv.

Diskusija

Obdelava semen s HPP po nekaterih raziskavah lahko občutno izboljša kalitev semen in rast rastlin (Ling s sod. 2014, Sivachandiran s sod. 2017). Na podlagi tega smo predvidevali, da se bo z daljšo izpostavitvijo hladni plazmi odstotek kalečih semen ajde povečal. Naši rezultati kažejo nasprotno. Odstotek kalečih semen se je zmanjševal z daljšo izpostavitvijo hladni plazmi, prav tako je pri obdelanih semenih prišlo do zakasnitve kaljivosti semen. Predvidevamo, da je pri obdelavi prišlo do poškodbe semen. Stopnja glivne infekcije se ni statistično razlikovala med kontrolo in različnimi tretmaji s hladno plazmo. Ker so semena kontrole kalila normalno sklepamo, da stopnja glivne kolonizacije ni vplivala na kaljivost semen. Ker se hladna plazma uporablja za dekontaminacijo semen (Waskow s sod. 2018), smo pričakovali, da bo imela obdelava negativen vpliv na glivno združbo semen. Številne raziskave kažejo, da obdelava semen s hladno plazmo inaktivira različne glive, vendar se njihove metode razlikujejo v trajanju izpostavitve od 30 sekund do 25 minut (Ma s sod. 2016; Kordas s sod. 2015). Naši rezultati kažejo, da izpostavitvev semen hladni kisikovi plazmi za 30 in 60 sekund še ni imela vpliva na stopnjo glivne infekcije in delež glivnih morfotipov, pri trajanju izpostavitve 90 in 120 sekund pa so bili učinki sicer vidni, a statistično neznačilni. Z daljšanjem izpostavitve semen se je zmanjševala stopnja glivne infekcije, a ne statistično značilno različno. Opažane so bile tudi razlike v deležu glivnih morfotipov, vendar ne v meri, kot smo pričakovali. Naš rezultat je morda posledica obdelave semen s plazmo pri nižji moči (200 W), saj so v predhodnih raziskavah ugotovili, da je razrast in prisotnost gliv praktično ničelna že pri 120 sekundni obdelavi s HPP pri moči 1300 W in 50 Pa (Fišer s sod., 2020). Poleg tega je potrebno poudariti, da smo s semen lahko izolirali le glive, ki rastejo na PDA gojišču. V literaturi tudi najdemo podatek, da so glive veliko bolj odporne na učinke hladne plazme kot bakterije. Ena izmed potencialnih razlag za to je enkapsulacija glivnih spor v nasprotju z nezaščiteno membrano bakterij. Po drugi strani pa nekatere raziskave kažejo tudi, da je odzivnost na obdelavo s hladno plazmo odvisna predvsem od okoliških pogojev eksperimenta (Soušková s sod., 2012). Tako obdelana semena kot v našem primeru, ne bi bila primerna za nadaljnjo kultivacijo. Naša raziskava je namreč pokazala, da je bil delež kaljivosti semen pri izpostavitvi semen HPP za 120 sekund le 18% in se med tretjim in sedmim dnevom ni povečeval kot pri drugih obravnavah. Poleg tega se glivne okužbe lahko prenašajo tudi iz generacije v generacijo, npr. rod *Epicoccum*, zaradi primernega ravnega okolja pod luščino semen ajde (Pongrac in sod., 2011, 2013 cit. v. Kovačec in sod., 2016). Iz rezultatov je tudi razvidno, da klasični način sterilizacije z vodikovim peroksidom bistveno bolje zavira tako glivno razrast kot vpliva na zmanjšanje prisotnosti različnih morfotipov gliv. Semena, ki bi bila primerna za nadaljnjo setev, bi tako morali izpostaviti hladni kisikovi plazmi za časovno obdobje, ki poda najboljše razmerje med čim nižjo ali praktično ničelno stopnjo glivne infekcije in dovolj uspešno kalitvijo, ki mora biti najmanj 80% pri navadni ajdi (po Uradnem listu RS, Pravilnik o trženju semena žit). Alternativno bi lahko to razmerje poiskali z uporabo višje moči hladne plazme ali spremenili drug parameter obdelave. Trenutna slabost obdelave s plazmo je tako predvsem variabilnost rezultatov dekontaminacije, na

katere vplivajo lastnosti naprave, ki plazmo proizvaja, pogoji obdelave, lastnosti obravnavane rastlinske vrste in specifičnost povezave rastline s patogenom (Adhikari s sod., 2020). Zaradi slednje trditve bi bile potrebne še nadaljnje raziskave optimizacije obdelave semen s hladno plazmo. Rodovi gliv, ki so bili najbolj zastopani pri naših obdelanih semenih ajde, so bili *Alternaria*, *Epicoccum* in *Didymella*. Najpogostejši rodovi gliv iz neobdelanih semen s plazmo, izolirane iz notranjosti semena v študiji Kovačec in sod., 2016 so bili podobni, in sicer *Alternaria*, *Epicoccum* in *Botrytis*, ki predstavljajo naravno prisotno mikofloro na semenih ajde, v študiji iz leta 1971 pa so podobno prevladovali rodovi *Alternaria*, *Botrytis* in *Cladosporium*, sledil je *Epicoccum* (Kovačec s sod., 2016; Mills in sod., 1971 cit. v. Kovačec in sod., 2016). Sama prisotnost rodov gliv je v veliki meri odvisna od časa in pogojev hrambe semen, kot sta vlaga in temperatura, veliko pa se jih prenaša med rastlinskimi vrstami in z vetrom v obliki spor. Naša semena ajde so bila ne glede na obdelavo s plazmo kontaminirana v največji meri z glivami rodu *Alternaria* (deloma tudi z *Botrytis*), ki sintetizirajo mikotoksine, ki skupaj z izločenimi encimi poškodujejo celične membrane, sama semena in preprečujejo uspešno kalitev zaradi iztekanja tekočin (Halooin, 1983 cit. v. Kovačec, 2016). Poleg tega ima *Epicoccum nigrum*, ki je bila prav tako močno prisotna v obdelanih semenih, lipazno aktivnost, ki uničuje enostavne rastlinske lipide kot so voski v kutikuli (Kovačec in sod., 2016). Ker mikotoksini omenjenih rodov po določenih raziskavah povzročajo pri človeku hematološke okvare, so genotoksični in so povezani z razvojem raka požiralnika, semena obdelana s hladno kisikovo plazmo, pri danih pogojih prav tako ne bi bila primerna za prehrano in krmo (Logrieco in sod. 2009; Miller, 1995; Soriano in Dragacci, 2004; cit. v. Kovačec in sod., 2016).

Zaključki

Obdelava semen s HPP je imela negativen učinek na kaljivost semen navadne ajde, kar je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji, zato lahko prvo hipotezo ovržemo. Pri daljših izpostavitvah semen hladni plazmi se statistično značilno nista zmanjšala ne stopnja glivne infekcije ne delež glivnih morfotipov. Druge in tretje hipoteze tako ne moremo sprejeti, vseeno pa podatki in literatura nakazujejo, da bi ob daljši izpostavitvi hladni plazmi lahko dobili statistično značilno spremembo. Glede na dobljene rezultate ne moremo reči, da smo uspeli poiskati najbolj optimalno izpostavitvev semen hladni kisikovi plazmi, ki bi v zadostni meri uničila glive, ki kontaminirajo semena ajde, hkrati pa bi ohranila primeren odstotek kaljivosti semen.

Literatura

- Adhikari B, Pangomm K, Veerana M, Mitra S, Park G, 2020. Plant Disease Control by Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma. *Frontiers in Plant Science*, 11: 77
- Campbell CG, 1997. Buckwheat. *Fagopyrum esculentum* Moench. V: Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. No. 19. Heller s sod (ur.). Rome, Italy, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources
- Farooq S, Rehman RU, Malik B, Dar FA, Bilal T, Tahir I, 2016. Cultivation, Agronomic Practices, and Growth Performance of Buckwheat. V: Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat. 1st ed. Zhou s sod (ur.). Oxford, Academic Press:

- 299–319
4. Fišer S, Klobučar N, Pavšič A, Vodnik L, Vršnik J, 2020. Vpliv nizkotemperaturne plazme na združbo gliv semen ajde. *Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum*; 11: 39–41
 5. Jiafeng J, Xin H, Ling L, Jiangang L, Hanliang S, Qilai X, Renhong Y, Yuanhua D, 2014. Effect of Cold Plasma Treatment on Seed Germination and Growth of Wheat. *Plasma Science and Technology*, 16: 54-58
 6. Kordas L, Pusz W, Czapka T, Kacprzyk R, 2015. The Effect of Low-Temperature Plasma on Fungus Colonization of Winter Wheat Grain and Seed Quality. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24: 433-438
 7. Ma R, Yu S, Tian Y, Wang K, Sun C, Li X, Zhang J, Chen K, Fang J, 2016. Effect of Non-Thermal Plasma-Activated Water on Fruit Decay and Quality in Postharvest Chinese Bayberries. *Food and Bioprocess Technology*, 9: 1825-1834
 8. 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*, 4, 7: 1822–1832
 9. Soušková H, Scholtz V, Julák J, Savická D, 2012. The Fungal Spores Survival Under the Low-Temperature Plasma. *NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology*, Chapter 5: 57-66
 10. Waskow A, Betschart J, Butscher D, Oberbossel G, Klöti D, Büttner-mainik A, Adamcik J, Rudolf_von_rohr P, Schuppler M, 2018. Characterization of Efficiency and Mechanisms of Cold Atmospheric Pressure Plasma Decontamination of Seeds for Sprout Production. *Frontiers in Microbiology*, 9: 3164
 11. Woo S-H, Roy SK, Kwon SJ, Cho SW, Sarker K, Lee M-S, Chung K-Y, Kim H-H, 2016. Concepts, Prospects, and Potentiality in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench): A Research Perspective. V: Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat. 1st ed. Zhou s sod (ur.). Oxford, Academic Press: 21–49

Vpliv hladne plinske plazme na kalitev in glivno združbo semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.)

Gregor Spruk, Gloria Krapež, Barbara Halas, Tijana Samardžić

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

- Namen našega dela je bil ovrednotenje učinkovitosti sterilizacije semen tatarske ajde s hladno plazmo.
- Za ovrednotenje škodljivih učinkov plazme na semena smo s plazmo obdelanim semenom določili kaljivost, učinkovitost sterilizacije pa smo ocenili na podlagi preraščanja plošč agarja z glivami s semen, obdelanih s plazmo. Glive smo ločili po morfotipih za spremljanje njihove raznovrstnosti.
- Kaljivost semen je z daljšanjem njihove izpostavitve plazmi hitro padla, vpliv plazme na rast gliv pa se je pokazala šele pri najdaljši izpostavitvi. Raznovrstnost morfotipov se je sprva povečala, nato je začela padati.
- V tej raziskavi uporabljen način sterilizacije semen ima prevelik vpliv na kaljivost semen in premajhnega na rast gliv.

Ključne besede: hladna plazma, tatarska ajda, glive, semena, dekontaminacija

Uvod

Zrna tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) so hrana, bogata z esencialnimi minerali in flavonoidi, ki delujejo kot antioksidanti (Bonafaccia in Fabjan, 2003). Njihovo proizvodnjo med drugim otežujejo okužbe s patogenimi glivami, med katerimi so pogostejše glive iz rodov *Alternaria*, *Botrytis* in *Epicoccum*. Glivne okužbe pogosto zmanjšajo kaljivost semen in otežijo razvoj kalčkov, kar se kaže predvsem na krajši dolžini korenin (Kovačec in sod., 2016). Te okužbe lahko zmanjšamo z uporabo fungicidov, ker pa so ti manj prijazni okolju, se v zadnjih letih razvija področje dekontaminacije semen s hladno plazmo. Primeren vir plazme je atmosferski zrak, sicer zaradi velikega deleža dušika v njem njegova plazma proizvaja več semenom škodljivega UV sevanja, kot ga denimo samo kisikova, a semena pred njim ščiti v zraku prisotna vodna para (Tomekova in sod., 2020). Plazma sterilizira površino semen z reaktivnimi kisikovimi in dušikovimi skupinami, ki nastajajo ob ionizaciji teh dveh plinov, UV sevanje pa je le stranski produkt tega procesa (Nagatsu in sod., 2003), ki lahko semenom škoduje s povzročanjem enojnih in dvojnih zlomov njihove DNA (Šubova in sod., 2020). Poleg sterilizacije pa izpostavitvev semen hladni plazmi tudi izboljša privzem vode v semena, ker se med obdelavo oksidirajo lipidi in polisaharidi na njihovi površini in jih s tem naredi bolj hidrofilne (Šubova in sod., 2020). Ker pozitivni učinki reaktivnih kisikovih in dušikovih skupin v plazmi na semena delujejo hitreje kot škodljivi učinki UV sevanja, ki ga oddaja plazma, je za uspešno sterilizacijo ter čim boljšo ohranitev viabilnosti semen ključnega pomena optimalen čas izpostavitve semen plazmi.

Da bi našli optimalen čas sterilizacije za semena tatarske ajde, smo jih v naši raziskavi za različna časovna obdobja izpostavili hladni kisikovi plazmi ter nato ovrednotili njihovo kaljivost in poskusili identificirati glive, ki smo jih izolirali iz semen, da bi ugotovili, kakšne posledice ima takšna sterilizacija na glivne združbe, prisotne na semenih. Predvidevamo, da bo z daljšanjem časa izpostavitve semen hladni plazmi upadla kaljivost semen ter da bo prišlo do zmanjšanja rasti in raznovrstnosti gliv, ki so prisotne na njih.

Materiali in metode

Semena tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) so nam na Inštitutu Jožefa Štefana razdelili v štiri skupine in jih različno dolgo (30 s, 60 s, 90 s, 120 s) izpostavili hladni kisikovi plazmi, proizvedeni v vakuumski cevi s pomočjo mikrovalov pri standardnih vrednostih (moč 200 W, tlak 50 Pa). Semena kontrolne skupine niso bila izpostavljena hladni plazmi. Po obdelavi so semena sterilno zaprli v vrečke.

Za kalitveni test smo pripravili pet petrijevok za vsako skupino obdelanih semen. Na dno vsake smo izrezali in položili dva filtrirna papirja. Vsako petrijevko smo napolnili z 20 semeni iste skupine in filtrirni papir prepojili z destilirano vodo. Enak postopek smo opravili še za kontrolno skupino. Kaljenje semen smo spremljali dnevno en teden, pri čemer smo po potrebi v petrijevke dolili destilirano vodo, da se semena niso izsušila. Kaljenje je potekalo v temi pri temperaturi 22°C in 60-70% vlažnosti.

Za glivne teste smo pripravili petrijevke z gojiščem s krompirjevim dekstroznim agarjem (PDA). Za vsako skupino smo pripravili 15 sterilnih petrijevok in v vsako na sredino plošče položili po eno seme ajde z enako časovno izpostavitvijo

plazmi. Za pozitivno kontrolo smo na 15 petrijevok s PDA gojiščem na sredino položili semena ajde, ki niso bila izpostavljena hladni plazmi. Za negativno kontrolo smo uporabili klasično metodo sterilizacije semen, in sicer tako, da smo kontrolna semena pred dodajanjem na plošče za 10 min namočili v 30% H₂O₂. Vse plošče s semeni smo zatesnili s plastično folijo in inkubirali v temi sedem dni na 20°C. Po koncu inkubacije smo določili stopnjo kolonizacije in morfološki tip gliv na vsaki plošči. Za oceno kolonizacije smo uporabili sedem-stopenjsko lestvico glede na premer rasti glive od nič, kjer ni bilo rasti gliv, do sedem, kjer je bila plošča popolnoma preraščena z glivami. Premer smo približno določili s pomočjo programa ImageJ.

Z morfortipiziranjem smo ocenili število različnih gliv na posamezni plošči, na osnovi njihove barve, oblike, površine ipd. Posamezne reprezentativne morfortipe iz vsaj dveh različnih plošč smo precepili na nove plošče PDA in jih inkubirali en teden pri enakih pogojih (tema, 20°C). Posamezne morfortipe smo precepili tako, da smo kos (dimenzije približno 0,5 cm x 0,5 cm) razrasle glive na robu izrezali s spatulo, predstavili na novo gojišče ter ponovno zavili v folijo. Vse plošče smo ustrezno označili in nato inkubirali v rastni komori pri enakih pogojih (sedem dni, tema, 20°C). Po koncu inkubacije smo petrijevko z izoliranim morfortipom ponovno precepili na dve sveži petrijevki z gojiščem PDA in ponovno inkubirali en teden pri enakih pogojih (sedem dni, tema, 20°C), da smo zagotovo izolirali čiste kulture gliv.

Nato smo čisto kulturo glive s pomočjo spatule postrgali z gojišča in prenesli v terilnico. Vzorec smo zalili s tekočim dušikom in strli s pestilom. Postopek smo ponovili dvakrat in vzorec prenesli v mikrocentrifugirke. Tako pripravljene vzorce smo nato shranili na -20°C za nadaljnjo izolacijo DNA. Vse rezultate smo statistično obdelali s testom ANOVA ter grafično prikazali s pomočjo Microsoft Excela. Predstavnike posameznih morfortipov smo shranili in jih pozneje fotografirali. Posamezne glivne morfortipe smo določili vsaj do rodu s pomočjo slikovnega določevalnega ključa na osnovi njihovih morfoloških lastnosti.

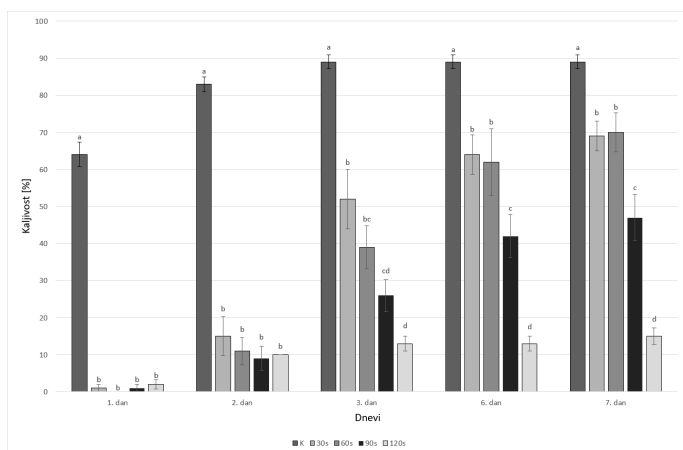
Rezultati

Vpliv plazme na kaljivost semen

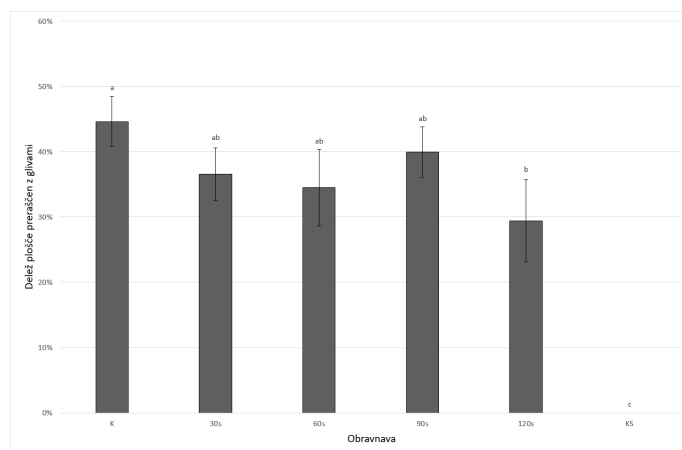
Obdelava semen s plazmo ima statistično značilen vpliv na kaljivost semen (slika 1). Kontrolna skupina se po prvem dnevu močno razlikuje od ostalih preiskovalnih skupin, saj je imela najvišjo stopnjo kalitve in ta trend vztraja do konca poskusa. Semena, ki so bila različno dolgo izpostavljena plazmi, se po deležu kaljivosti šele po tretjem dnevu začnejo statistično razlikovati med seboj. Ob koncu poskusa se plazemsko obdelana semena razdelijo v tri med seboj statistično ločene skupine, pri čemer imajo semena, ki so bila plazmi izpostavljena 120 s, najslabšo kaljivost, sledijo semena, izpostavljena 90 s, skupina semen s 60 s in 30 s izpostavitvijo pa se med seboj statistično ne razlikujeta.

Vpliv plazme na glivne združbe semen

Obdelava semen s plazmo ni imelo velikega vpliva na površino plošč, ki so jo prerastle glive (slika 2). Preraščena površina se je statistično značilno razlikovala od kontrole šele pri semenih, ki so bila plazmi izpostavljena 120 s. Prav tako na osnovi



Slika 1: Povprečni delež skaljenih semen po sedmih dneh in SE za kontrolno skupino (K) in semena z različno časovno izpostavitvijo plazmi (30 s, 60 s, 90 s, 120 s) (n=5). S črkovno oznako (a, b, c, d) so označene statistično značilne razlike med skupinami na osnovi enosmerne analize variance (ANOVA), Duncan post hoc test, $p < 0,05$.



Slika 2: Povprečni deleži površin plošč, preraščeneh z glivami pri kontroli (K) in semenih, ki so bila za različne časovne intervale izpostavljena hladni plazmi (30, 60, 90 in 120 s) ter sterilni kontroli (KS). Prikazane so povprečne vrednosti +/- SE (n=15). Črkovne oznake (a,b,c) prikazujejo statistično značilne razlike na osnovi enosmerne analize variance (ANOVA) in Fisher LSD post hoc testa, $p < 0,05$.

naših rezultatov težko govorimo o trendu upadanja rasti gliv s časom izpostavitve semen hladni plazmi, z izjemo najvišje izpostavitve.

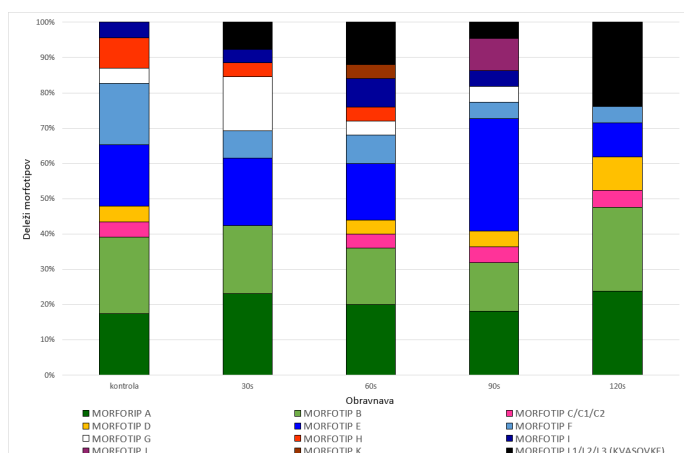
Prav tako čas izpostavitve plazmi ni imel pričakovanega učinka na raznovrstnost morfotipov, število katerih se je pri 60 s in 90 s izpostavitvi semen plazmi celo povečalo nad število različnih morfotipov, ki so bili prisotni na kontrolnih semenih.

S pomočjo določevalnega ključa smo izoliranim morfotipom poskusili določiti vrste, a nam to ni popolnoma uspelo zaradi podobnosti med vrstami nekaterih rodov. Na podlagi izgleda smo tako morfotipe razvrstili v štiri rodove in štiri vrste.

Morfotipa A in B sta predstavnika vrste *Epicoccum nigrum*, H je predstavnik *Botrytis cinerea* in K pripada vrsti *Rhizopus oryzae*.

Morfotipe C, E, F in I smo uvrstili v rod *Alternaria*, morfotip G v rod *Didymella*, morfotip J v rod *Cladosporium* ter L v rod *Hannaella*. Morfotipu D pa nam ni uspelo določiti rodu.

Obravnava s plazmo ni imela očitnega učinka na glive iz rodu



Slika 3: Po morfotipih razčlenjene združbe gliv, ki so zrastle na semenih kontrole (K) ter semenih, ki so bila za različne časovne intervale izpostavljena hladni plazmi. Pri vsaki obravnavi je prikazano kolikšen delež vseh na semenih rastočih gliv predstavlja posamezni morfotip. Semen sterilne kontrole (KS) ni na grafu, ker na njih ni zrastle nobena gliva.

Alternaria in vrsto *Epicoccum nigrum*. Pričakovan učinek ima le na vrsto *Botrytis cinerea*, ki se ni pojavila po 90 s obravnavanja s plazmo, medtem ko so glive iz rodu *Hannaella* z daljšanjem obravnave pogostejše. Glive vrste *Rhizopus oryzae* so se pojavile le pri 60 s obravnavi, glive rodu *Cladosporium* pa le pri 90 s obravnavi. Glive iz rodu *Didymella* se niso pojavile le pri 120 s obravnavi, a je bilo njihovo število pri 30 s obravnavi večje kot pri kontroli.

Diskusija

Uporaba nizkotemperaturne kisikove plazme za sterilizacijo semen je obetajoča metoda, a lahko vpliva tudi na njihovo kaljivost. Obdelava s hladno plinsko plazmo lahko stopnjo kaljivosti zviša ali zniža, odvisno od uporabljene naprave in pogojev sterilizacije ter vrste rastline, katere semena steriliziramo (Šera in sod., 2018). Tudi naši rezultati kažejo na odvisnost kaljivosti semen od pogojev sterilizacije. Ta je pri nas padala relativno hitro, saj se je že pri 30 s izpostavitvi semen plazmi njihova kaljivost po sedmih dneh znižala z 89% na 69%, medtem ko pri nekaterih drugih raziskavah (Selcuk in sod., 2008; Kordas in sod., 2015; Šubova in sod., 2020) kaljivost začne padati veliko kasneje. Težko je določiti, kateri parametri pri obdelavi s hladno plazmo so ključni za ohranitev visoke kaljivosti, saj se ti med raziskavami razlikujejo. Naši raziskavi je od prej omenjenih raziskav najbolj podobna raziskava Selcuka in sod. (2008), pri kateri so uporabili podobno sterilizacijsko napravo, kot je bila tista, s katero so bila sterilizirana naša semena, sterilizacijo pa so izvedli pri podobnih pogojih kot mi (moč 300W, tlak 66,7Pa). Semena pšenice so sterilizirali v časovnih intervalih med 5 in 20 min s plazmo, generirano iz okoljskega zraka ali SF6. Kljub večji moči uporabljeni pri proizvodnji plazme in veliko daljšim izpostavitvam semen plazmi pri njih kaljivost le-teh ni padla pod 85%. Ključna razlika med obema eksperimentoma je bila uporaba različnih plinov za proizvodnjo plazme. O vplivu SF6 plazme na semena ni veliko znanega, medtem ko se za plazmo, proizvedeno iz zraka ve, da je manj škodljiva za semena, saj vodna para, ki je prisotna v njem, te ščiti pred UV sevanjem (Tomekova in sod.,

2020). Kljub temu uporaba zraka za proizvodnjo plazme ne more popolnoma pojasniti visoke kaljivosti semen v raziskavi Selcuk in sod. (2008), saj v drugih raziskavah (Šera in sod., 2012; Šubova in sod., 2020) po 10 min izpostavitvi semen iz zraka proizvedeni plazmi kaljivost teh vseeno začne upadati. V našem poskusu je imela izpostavitve semen plazmi vpliv na rast gliv, a se ta pokaže šele pri 120 s obravnavi. Podobne rezultate so dobili tudi Selcuk in sod. (2008) ter Filatova in sod. (2012), a je pri njih zaradi daljše časovne izpostavitve plazmi upad rasti gliv še bolj razviden. Ker je učinkovitost sterilizacije semen odvisna od vrste plina in naprave, ki smo ju uporabili za proizvodnjo plazme ter semen, ki jih steriliziramo (Selcuk in sod., 2008; Charoux in sod., 2020), pa ne moremo zagotovo trditi, da bi bili rezultati sterilizacije semen tatarske ajde z našo metodo pri daljši izpostavitvi semen plazmi enaki. Upadanje rasti gliv pri našem poskusu ni konstantno, kar je lahko posledica različnega vpliva plazme na posamezne vrste gliv. V rezultatih raziskave Filatove in sod. (2012), v kateri so opazovali stopnjo rasti posameznih rodov gliv na različnih semenih, je namreč stopnja rasti gliv iz rodov *Fusarium* in *Stemphylium* na semenih graha ostala skoraj nespremenjena, medtem ko je stopnja rasti gliv iz rodu *Alternaria* padla za skoraj 20% po 5 min sterilizacije. Na semenih volčjega boba pa je bila rast gliv iz rodu *Alternaria* skoraj nespremenjena tudi po 20 min sterilizacije. Stopnja rasti posameznih vrst gliv je v naši raziskavi težko določiti, ker so te pogosto rasle ena čez drugo. Določili smo le pojavnost vrst oziroma rodov gliv pri posamezni obravnavi. Z daljšanjem časa izpostavitve plazmi skoraj ni prišlo do upada njihove raznovrstnosti, ta se je pri 30 in 60 sekundni sterilizaciji celo povečala. Zakaj je do tega prišlo, ne vemo, lahko da je plazma oslabilo glive vrste *Epicoccum nigrum* in rodu *Alternaria*, ki so dominirale na kontrolnih semenih, zaradi česar so lahko zrasle tudi počasneje rastoče, a na obravnavanje s plazmo bolj odporne glive. Z daljšanjem časa izpostavitve plazmi pa ta prednost ni dovolj, da bi lahko te glive kljubovale škodljivim učinkom plazme, tako da se zmanjša tudi stopnja njihove rasti.

Zaključki

Zaradi velikega padca v kaljivosti semen in majhnega vpliva na rast gliv sklepamo, da način sterilizacije semen, uporabljen v naši raziskavi (z danimi parametri hladne plazme), ni primeren za sterilizacijo semen tatarske ajde. Najverjetneje v kratkem času izpostavitve semen plazmi zaradi nizkega tlaka v vakuumski cevi ioni ne poškodujejo gliv do te mere, da ne morejo zrasti, a hkrati nastane dovolj UV sevanja, da se poškoduje DNK semen in ta ne morejo vzkliti. Metodo bo

potrebno pred uporabo dodatno optimizirati s spreminjanjem tlaka, plina za proizvodnjo plazme in potencialno tudi dovedene moči, preden bomo lahko poiskali optimalen čas za sterilizacijo semen.

Literatura

1. Bonafaccia G in Fabjan N, 2003. Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet.: 349 - 355
2. Charoux CMG, Patange A, Lamba S, O'Donnell CP, Tiwari BK, Scannell AGM, 2020. Applications of nonthermal plasma technology on safety and quality of dried food ingredients. Journal of Applied Microbiology. DOI:https://doi.org/10.1111/jam.14823: 16 str.
3. Filatova I, Azharonok V, Shik A, Antoniu A, Terletskaia N, 2012. Fungicidal Effects of Plasma and Radio-Wave Pre-treatments on Seeds of Grain Crops and Legumes. Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology, Demänovská dolina, Slovakia.
4. Kordas L, Pusz W, Czapka T, Kacprzyk R, 2015. The Effect of Low-Temperature Plasma on Fungus Colonization of Winter Wheat Grain and Seed Quality. Pol. J. Environ. Stud. 24. (1): 380-383
5. Kovačec E, Likar M, 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
6. Nagatsu M, Terashita F, Koide J, 2003. Low-Temperature Sterilization with Surface-Wave-Excited Oxygen Plasma. Jpn. J. Appl. Phys.:42: L 856-L 859
7. 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
8. Šerá 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
9. Tomekova J, Kyzek S, Medvecká V, Galová E, Zahoranová A, 2020. Influence of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Pea Seeds: DNA Damage of Seedlings and Optical Diagnostics of Plasma. Plasma Chemistry and Plasma Processing: 40: 1571-1584
10. Šerá B in Šerý 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
11. Šubová R, Kyzek S, Medvecká V, Slovákova L, Gálová E, Zahoranová A, 2020. Novel insight at the Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on the Activity of Enzymes Essential for the Germination of Pea (*Pisum sativum* L. cv. Prophet) Seeds. Plasma Chemistry and Plasma Processing: 40:1221-1240

Vpliv hladne plinske plazme na kaljivost in glivno združbo semen pšenice sorte Ingenio

Eva Hajšek, Katarina Lenarčič, Jan Štangelj, Ana Žuran

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

- Želeli smo preveriti vpliv hladne plinske plazme (HPP) na kaljivost in glivno združbo semen pšenice (*Triticum aestivum* L.) sorte Ingenio.
- Semena pšenice so bila obdelana s hladno kisikovo plazmo pri tlaku 50 Pa, moči 200 W, ter različnih časih izpostavitve: 0, 30, 60, 90 in 120 sekund. Tekom enega tedna smo opazovali njihovo kalitev in iz semen izolirali glive ter ocenili stopnjo njihove rasti in diverziteto na nivoju morfotipov.
- Semena, ki so hladni kisikovi plazmi bila izpostavljena dlje časa, so kalila slabše, toda stopnja glivne rasti je bila praviloma manjša, prav tako pa tudi število prisotnih glivnih morfotipov.

Ključne besede: pšenica, hladna kisikova plazma, kaljivost semen, stopnja glivne rasti, glivni morfotipi, dekontaminacija

Uvod

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je najpomembnejši osnovni pridelek v zmernih geografskih pasovih in povpraševanje po njej se povečuje v državah v razvoju. Je glavni vir škroba in energije v prehrani ljudi, vsebuje pa tudi precejšnje količine številnih snovi, ki so bistvene ali koristne za zdravje, zlasti beljakovine, vitamine (zlasti vitamine B), prehranske vlaknine in antioksidativne snovi (Shewry, 2015). Pšenice pa ne uporabljamo zgolj za prehrano, temveč je veliko porabimo tudi kot krmo za živali. Po podatkih Eurostata letno v Evropski uniji proizvedemo okoli 140 milijonov ton pšenice, kar je 57 % več kot kuzuze, ki je prav tako pomemben vir škroba (Eurostat, 2019).

Kakovost navadne pšenice in izdelkov na osnovi pšenice pogojujejo številne lastnosti. Ene izmed ključnih so vsebnost beljakovin, kakovost beljakovin in prisotnost onesnažil, ki vplivajo na varnost teh živil. Varnost živil je na splošno povezana z odsotnostjo toksičnih plesni in njihovih sekundarnih metabolitov, mikotoksinov (Hajnal in sod., 2019). Mikotoksini so sekundarni metaboliti gliv, ki lahko okužijo pridelke tako na polju kot tudi med spravilom oz. po njem. Plesnivost oziroma okužba pridelka z glivami ne pomeni vedno, da je prisoten tudi mikotoksin. Prav tako lahko glive že odmrjejo, mikotoksini pa ostanejo prisotni (KIS, 2020). Za tvorbo mikotoksinov v metabolnih procesih gliv morata biti izpolnjena dva pogoja: okolijski pogoji za okužbe z glivami in signal glivam, da tvorijo toksine. Signal lahko predstavljajo vremenske razmere, fungicidi, tekmovalnost z drugimi mikroorganizmi za življenjske vire, prevelika gostota itd. (Kolmanič, 2020).

Za zmanjševanje tveganja okužb z glivami in posledično mikotoksini se borimo preventivno z izbiro sorte pšenice, kolobarjenjem, ustrezno obdelavo tal in skrbjo za ostanke prejšnjih poljščin na njivi, s tem kako so rastline oskrbovane s hranili, s časom setve, gostoto setve ter plevelom. S kemikalijami lahko zmanjšujemo tveganje tako pred, kot tudi po okužbi z glivnimi patogeni. Vendar zares učinkovitih fungicidov nimamo, le ti zmanjšajo vsebnost mikotoksinov za 20-60 %. Hkrati pa moramo poudariti, da gre tukaj za snovi, ki nimajo vpliva le na glive, temveč vplivajo tudi na zdravje ljudi (Kolmanič, 2020). Pojavlja se vedno več zamisli kako rešiti problem kontaminacije semen z glivami, eno izmed njih predstavlja tudi obdelava semen pšenice s HPP, ki smo jo pri tem poskusu uporabili tudi mi.

Izboljšanje kaljivosti semen je odvisno od značilnosti semen določene rastline in različnih tehnik generiranja plazme, med katere prištevamo mikrovalove, radiofrekvenčne valove, visokofrekvenčne valove in magnetizirano razelektritev. Po obdelavi semen s HPP ne ostane nobenih onesnaževalcev okolja, ker za obdelavo niso potrebne kemikalije. Semena obdelana s HPP niso uničena, ker aktivne vrste prodrejo le približno 10 nm globoko, tako da kalček ostane funkcionalen tudi po obdelavi. Dosedanje študije so pokazale, da lahko obdelava s HPP izboljša kaljivost semen in hitrost rasti več rastlinskih vrst, med njimi tudi pšenice, kar bi lahko znatno povečalo njen donos. Obdelava s HPP je torej hitra, varčna in okolju prijazna metoda za izboljšanje lastnosti semen (Guo in sod., 2017). Namen in cilj našega poskusa je bil preveriti vpliv hladne kisikove plazme na združbo gliv na semenih pšenice ter vpliv plazme na kaljivost semen.

Hipoteze

- Najmanjšo kaljivost bodo imela semena pšenice, ki so bila najdlje izpostavljena HPP.
- Z daljšo izpostavitvijo semen pšenice HPP se bo zmanjšala stopnja kontaminacije z glivami.
- Z daljšo izpostavitvijo semen pšenice HPP se bo znižalo število različnih morfotipov gliv.

Materiali in metode

Obdelava semen s hladno plinsko plazmo

Semena pšenice (*Triticum aestivum* L.) sorte Ingenio so na inštitutu Jožefa Štefana obdelali s hladno kisikovo plazmo, in sicer pri tlaku 50 Pa ter moči 200 W. Parametri so bili pri vseh obdelavah enaki, spreminjal se je le čas izpostavitve plazmi: 0, 30, 60, 90 in 120 sekund. Čas izpostavitve 0 sekund je predstavljal kontrolno skupino. Z vsako časovno obdelavo so obdelali cca. 150 semen, od katerih smo njih 100 uporabili za določitev vpliva HPP na kaljivost, 15 pa za določitev vpliva HPP na mikrobiom semen (glive).

Kalitveni test

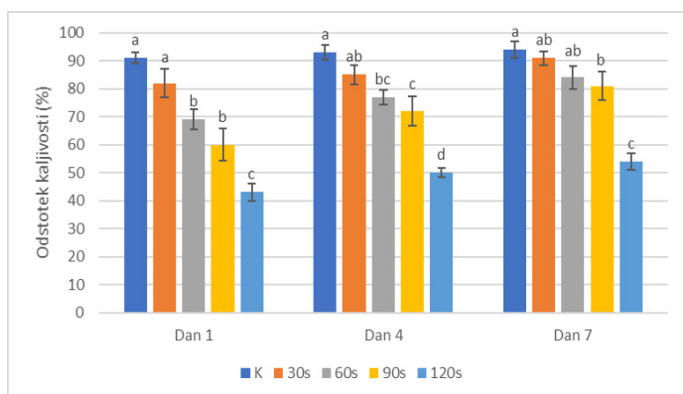
Za kalitveni test smo pripravili petrijevke z navlaženim filter papirjem in vanje razporedili po 20 semen določene obdelave. Za vsako obdelavo smo naredili 5 paralelnih ponovitev (5 petrijevk), tako da smo skupno imeli po 100 semen za vsako obdelavo. Tako pripravljene petrijevke smo dali kalit v temo, v rastne komore pod kontrolirane pogoje: temperatura 22°C in 60-70 % vlažnost. Test je potekal 7 dni, na dogovorjene dneve (1., 4. in 7. dan od nastavitve testa) pa smo spremljali kalitev oz. prešteli število kalečih semen.

Izolacija gliv iz semen (kultivacija)

Za kultivacijo gliv smo uporabili bogata gojišča PDA («potato dextrose agar») z dodanim antibiotikom kloramfenikolom. Za vsako obdelavo smo v 15 paralelnih ponovitvah sterilno postavili po 1 seme na sredino petrijevke s PDA gojiščem. Posebej smo pripravili še klasično sterilizirano kontrolo (KS), in sicer iz neobdelanih semen (0 s), ki smo jih predhodno za 10 minut namočili v 30 % vodikov peroksid (H₂O₂). Plošče z nacepljenimi semeni smo nato zatesnili s prozorno folijo za živila, jih položili v škatlo in dali v rastne komore pod kontrolirane pogoje: sobna temperatura, cca. 20°C v temi.

Morfotipizacija in pridobitev čistih kultur ter izolacija gliv iz plošč

Po enotedenski kultivaciji smo plošče pregledali, ocenili stopnjo glivne rasti in, glede na morfološke lastnosti (barva, oblika, površina ipd.), glive razdelili v razrede oz. morfotipe. Poleg tega smo prešteli, koliko jih kolonizira posamezno seme. Nadalje smo po 2 ali 3 predstavnike istega morfotipa (iz različnih plošč) precepili naprej. Po enotedenski kultivaciji smo plošče pregledali in glive ponovno precepili do čistih kultur. Glive smo nato s spatulo postrgali iz agarnih plošč, jih strli v tekočem dušiku in prenesli v mikrocentrifugirke ter shranili na -20°C za kasnejšo uporabo oz. izolacijo DNA.



Slika 1: Graf prikazuje rezultate testa kaljivosti za dan 1, 4 in 7. Z odstotkom kaljivosti je prikazano, koliko semen je povprečno vzkliko pri posamezni obdelavi. Na grafu so označene tudi standardne napake ($n = 5$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami (enosmerna ANOVA, Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$). K - kontrola; 30s - 30-sekundna izpostavitvev plazmi; 60s - 60-sekundna izpostavitvev plazmi; 90s - 90-sekundna izpostavitvev plazmi; 120s - 120-sekundna izpostavitvev plazmi.

Rezultati

Kaljivost semen

V petrijevkah z 20 semeni posamezne obdelave, ki smo jih kalili v temi, smo na dan 1., 4. in 7. prešteli semena, ki so vzklikla. Na Sliki 1 lahko vidimo odstotek kaljivosti za posamezno obdelavo in standardne napake.

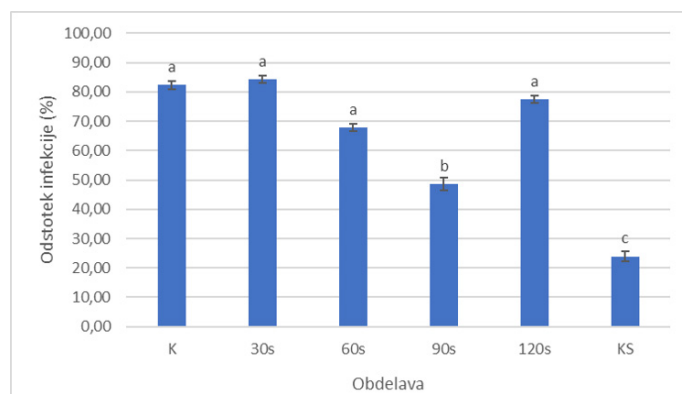
Na začetku vidimo, da so najboljše kalila kontrolna semena in semena, ki so bila izpostavljena plazmi najmanj časa, torej 30 s. Najslabše so kalila semena, ki so bila najdlje izpostavljena plazmi, torej 120 s. Po 7. dneh statistično značilne razlike med kontrolnimi semeni ter 30 s in 60 s obdelavo ni. Kontrolnih semen je v povprečju vzkliklo 94 %, semen 30 s obdelave 91 %, 60 s obdelave 84 % in 90 s obdelave 81 %. Statistično gledano lahko rečemo, da je 90 s obdelava kalila slabše v primerjavi s kontrolno skupino. Precej slabše so kalila semena najdaljše obdelave (120 s), teh je skalilo le 54 %.

Rast in morfotipizacija gliv

Po 7 dneh smo določili odstotek infekcije, torej stopnjo glivne rasti na ploščah, ki je prikazana na Sliki 2.

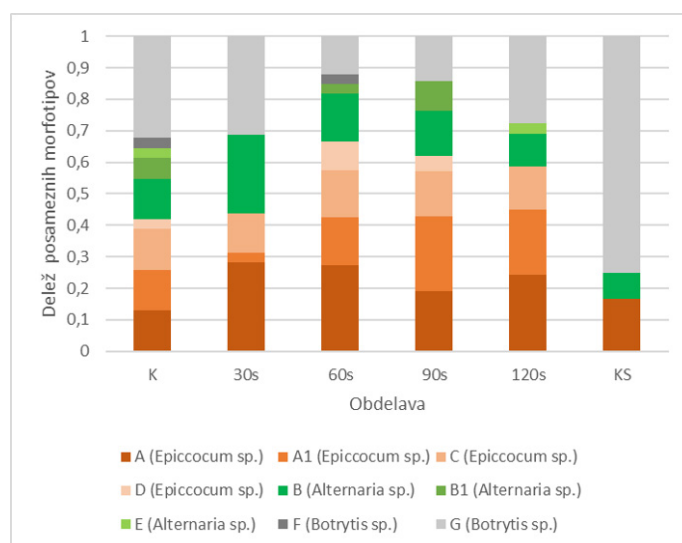
Stopnja rasti pri kontroli, 30 s in 120 s obdelavi je bila okrog 80 %, nekoliko manjša pri 60 s obdelavi - malo manj kot 70 %, čeprav statistično značilnih razlik pri teh obdelavah ne vidimo. Manjša je bila rast pri 90 s obdelavi (okrog 50 %) in najmanjša pri sterilizirani kontroli - okrog 24 %.

Glive smo glede na morfološke lastnosti razdelili v morfotipe in jih opisali. Opisi morfotipov skupaj s fotografijami so v Prilogi. S pomočjo slikovnega ključa smo posamezne morfotipe določili do rodu. Morfotipi A, A1, C in D pripadajo rodu *Epiccocum*, morfotipi B, B1 in E rodu *Alternaria*, F in G pa rodu *Botrytis*. Diverzitetni diagram (Slika 3) prikazuje delež posameznih morfotipov za vsako časovno obdelavo. Ker posamezne morfotipe lahko uvrstimo v le 3 rodove, so za boljši prikaz glivne diverzitetne morfotipi iz istega rodu obarvani z različnimi odtenki iste barve kot je razvidno iz Slike 3.



Slika 2: Stopnja glivne rasti (povprečje +/- standardna napaka, $n = 15$). Odstotek infekcije prikazuje, kakšna je bila rast glivnih hif po plošči. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami (enosmerna ANOVA, Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$). K - kontrola; 30s - 30-sekundna izpostavitvev plazmi; 60s - 60-sekundna izpostavitvev plazmi; 90s - 90-sekundna izpostavitvev plazmi; 120s - 120-sekundna izpostavitvev plazmi; KS - kontrola sterilizirana s 30% H_2O_2 .

Pri kontrolni skupini so bili prisotni vsi določeni morfotipi (9), pri sterilizirani kontroli pa le trije. Prav tako se razlikuje število različnih morfotipov med semeni, ki so bila izpostavljena HPP: najmanj jih je bilo prisotnih pri 30 s obdelavi (5), največ pa pri 60 s (8); pri 90 s obdelavi jih je bilo 7, pri 120 s obdelavi pa 6. Najpogostejši morfotipi so bili A, B in G, le-ti so bili prisotni pri vseh obdelavah. Najredkeje pa sta se pojavila morfotipa E in F. Na taksonomskem nivoju so bili prisotni le trije rodovi: *Epiccocum*, *Alternaria* in *Botrytis*. Vsi rodovi se pojavljajo pri vseh obdelavah, vendar v različnih deležih. Pri kontrolni skupini sta rodova *Epiccocum* in *Botrytis* približno enako zastopana, malo manj je zastopan rod *Alternaria*. Podobno je pri 30 s obdelavi. Pri 60 s in 90 s obdelavi je rod *Botrytis* nekoliko manj zastopan, rod *Alternaria* podobno kot pri prejšnjih dveh, večkrat se je pojavil rod *Epiccocum*. Pri 120 s obdelavi



Slika 3: Diverzitetni diagram prikazuje delež posameznega morfotipa za vsako obdelavo. K - kontrola; 30s - 30-sekundna izpostavitvev plazmi; 60s - 60-sekundna izpostavitvev plazmi; 90s - 90-sekundna izpostavitvev plazmi; 120s - 120-sekundna izpostavitvev plazmi; KS - kontrola sterilizirana s 30% H_2O_2 .

se najmanjkrat pojavi *Alternaria*, najbolj pa je zastopan rod *Epicoccum*. Največjo razliko vidimo pri sterilizirani kontroli, kjer se največkrat pojavijo glive iz rodu *Botrytis*, v najmanjšem številu je zastopana *Alternaria*, večkrat se pojavi *Epicoccum*.

Diskusija

Pred začetkom opravljanja poskusov smo predvidevali, da bodo najslabše kalila tista semena pšenice, ki so bila najdlje izpostavljena HPP. Novejše raziskave kažejo, da ima obdelava semen s HPP pozitiven učinek na njihovo kalitev (Filatova in sod., 2011; Khamsen in sod., 2016). Naši rezultati pa se z zaključki teh raziskav ne skladajo, saj nismo opazili, da bi obdelava s HPP povečala kaljivost semen. Ravno nasprotno, daljši kot je bil čas obdelave, manjši je bil odstotek kaljivosti – tako se je izkazalo, da je odstotek kaljivosti semen odvisen od časa obdelave. V našem primeru so semena iz krajše obdelave s HPP (30 s) na koncu (7. dan), dosegla skoraj enak odstotek kaljivosti kot semena iz kontrolne skupine. Pri 30, 60 in 90-sekundnih obdelavah na splošno nismo opazili velikega padca kaljivosti (v primerjavi s kontrolno skupino je razlika manjša od 10 %). Z Duncanovim post-hoc testom smo tudi primerjali statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami. Statistično značilne razlike opazimo pri kontrolni skupini ter 90 in 120 s obdelavi, medtem ko se 30 in 60 s obdelava statistično prekrivata s kontrolo in 90 s obdelavo. Do najopaznejšega padca je prišlo pri 120 s obdelavi (53 % kaljivost).

Stopnja glivne kolonizacije oz. rasti se je pri semenih obdelanih s HPP zmanjšala, kar kaže tudi poskus Kordas in sod. (2015). Naši rezultati so pokazali, da je stopnja glivne rasti največja pri semenih iz kontrolne skupine in 30 s obdelave. Pri daljših obdelavah (60 s, 90 s) pa se je stopnja glivne rasti zmanjšala. Nenavadno velik odstotek rasti smo opazili pri 120 s obdelavi (78 %), kar je najverjetneje posledica sekundarnih kontaminacij pri delu in majhnega števila ponovitev poskusa. Pri kontroli sterilizirani s 30% H₂O₂ pa je bila stopnja glivne rasti pričakovano najmanjša (24 %). Poskus bi bilo vsekakor smiselno ponoviti. Predvidevamo, da bi 120 s obdelava semen s HPP lahko bistveno vplivala na njihovo sterilizacijo, vendar bi potrebovali večji vzorec semen in izvesti bi morali več ponovitev. Tako bi lahko z večjo natančnostjo ugotovili, kolikšna je potrebna časovna izpostavljenost HPP, da bi posledična glivna rast bila primerljiva glivni rasti sterilizirane kontrole.

Izolirane glive smo razdelili v 9 različnih morfotipov. Pogostost pojavljanja posameznih morfotipov med obdelavami se je razlikovala. Predvidevali smo sicer, da se bo število različnih morfotipov pri daljši obdelavi znižalo, ampak iz naših rezultatov to ni najbolj razvidno. Najmanjšo diverzitetno morfotipov smo namreč opazili pri 30 s obdelavi, največjo pa pri 60 s – nadalje se je pri 90 in 120 s obdelavi diverzitetna res nekoliko znižala. Odstopanja, ki so se pojavila pri 30 s obdelavi nakazujejo, da bi za zanesljivejše rezultate morali opraviti več ponovitev. Tudi sama ocena glivne diverzitetne na nivoju morfotipov ni najbolj zanesljiva. Izkazalo se je, da določene morfotipe (na podlagi slikovnega ključa) lahko uvrstimo v le tri večje rodove: *Epicoccum*, *Alternaria* in *Botrytis*. Med njimi je nekoliko prevladal rod *Epicoccum*, so se pa vsi približno enakomerno pojavili pri vseh obdelavah. Tako da iz dobljenih rezultatov nismo mogli zanesljivo oceniti vpliva HPP na glivno

združbo semen. Za natančnejši prikaz glivne diverzitetne bi morali poseči po genetskih analizah, kar bi nam omogočilo identifikacijo potencialnih patogenov.

Z daljšo obdelavo semen pšenice s HPP se je resda zmanjšalo število glivnih morfotipov in potencialnih patogenov, vendar se je po drugi strani zmanjšala tudi kaljivost semen. S kmetijskega vidika takšna obdelava s HPP torej najverjetneje ne bi bila najbolj uporabna, predvsem na račun slabše kaljivosti. Smiselno bi bilo raziskave usmeriti v testiranje različnih vrst in mešanic uporabljenih plinov za dekontaminacijo semen s HPP. Prilagoditi pa bi bilo treba tudi čas obdelave, saj se za učinkovitejše izkažejo krajši časovni intervali.

Zaključki

- Predvidevali smo, da bodo najmanjšo kaljivost imela semena pšenice, ki so bila najdlje izpostavljena HPP. Na podlagi naših rezultatov lahko hipotezo potrdimo. Semena, ki so bila HPP izpostavljena dlje časa, so imela manjši odstotek kaljivosti v primerjavi s semeni iz kontrolne skupine, ki niso bila obdelana.
- Pri daljši izpostavitvi semen pšenice HPP smo pričakovali zmanjšano stopnjo glivne kontaminacije. To naši rezultati deloma potrjujejo, zato tudi to hipotezo lahko delno potrdimo, vendar bi za zanesljivejše rezultate morali izvesti več ponovitev poskusa.
- Predvidevali smo, da se bo z daljšanjem časovne obdelave semen s HPP zmanjšalo število različnih morfotipov. Iz naših rezultatov to ni najbolj razvidno, zato te hipoteze ne moremo potrditi. Za natančnejšo določitev diverzitetne bi morali poseči po genetskih analizah.

Literatura

1. Eurostat, 2019. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agricultural_production_-_crops (10. dec. 2020)
2. Filatova, I., Azharonok, V., Gorodetskaya, E., Mel, L., Shedikova, O., in Shik, A. 2009. Plasma-radiowave stimulation of plant seeds germination and inactivation of pathogenic microorganisms. *Ispc_19* 10: 4–7
3. Guo, Q., Meng, Y., Qu, G., Wang, T., Yang, F., Liang, D., in Hu, S. 2018. Improvement of wheat seed vitality by dielectric barrier discharge plasma treatment. *Bioelectromagnetics* 39: 120–131
4. Hajnal, E. J., Vukić, M., Pezo, L., Orčić, D., Puač, N., Škor, N., Milidrag, A., in Simović, D. Š. 2019. Effect of atmospheric cold plasma treatments on reduction of alternaria toxins content in wheat flour. *Toxins* 11: <https://doi.org/10.3390/toxins11120704>: 17 str.
5. Khamsen, N., Onwimol, D., Teerakawanich, N., Dechanupaprittha, S., Kanokbannakorn, W., Hongesombut, K., in Srisophon, S. 2016. Rice (*Oryza sativa* L.) Seed Sterilization and Germination Enhancement via Atmospheric Hybrid Nonthermal Discharge Plasma. *ACS Applied Materials and Interfaces* 8: 19268–19275
6. KIS, 2020. <https://www.kis.si/Mikotoksini/> (10. dec. 2020)
7. Kolmančič, A. 2020. Kmetijski inštitut. http://www.kmetzav-mb.si/Lombergar_18/Lomb_7_2_18.pdf (10. dec. 2020)
8. Kordas, L., Pusz, W., Czapka, T., in Kacprzyk, R. 2015. The effect of low-temperature plasma on fungus colonization of winter wheat grain and seed quality. *Polish Journal of Environmental Studies* 24: 433–438
9. Shewry, P. R., in Hey, S. J. 2015. The contribution of wheat to human diet and health. *Food and Energy Security* 4: 178–202

Vpliv hladne plazme na kaljivost in glivno združbo semen pšenice (*Triticum aestivum*) sorte Bernstein

Belec Nina, Brvar Matic, Pajek Arambašič Neža, Popović Maja

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

- Določali smo kako različno dolge izpostavitve hladni plinski plazmi (HPP) vplivajo na semena navadne pšenice (*Triticum aestivum*) sorte Bernstein. Opredelili smo vpliv HPP na kalitev in na glivno združbo semen.
- Semena pšenice smo izpostavili različno dolgim časovnim obdelavam s HPP. Pri različno dolgo izpostavljenih semenih smo določili odstotek kalitve, diverzitetu glivne združbe in pogostnost posameznih glivnih vrst. Glive smo iz semen izolirali tako, da smo semena prenesli na PDA gojišče za en teden in nato ocenili glivno kolonizacijo. Iz čistih kultur smo na osnovi morfoloških lastnosti določili vrstno sestavo (glivno združbo semen).
- Opazili smo, da daljše izpostavitve HPP vodijo v zmanjšanje kaljivosti pšeničnih semen, ter da daljše izpostavitve vodijo v zmanjšanje diverzitetu glivne združbe pšeničnih semen.

Ključne besede: hladna plazma, glive, semena pšenice (*T. aestivum*), dekontaminacija

Uvod

Poljščine, kot je pšenica (*Triticum aestivum*), so najosnovnejši in najpomembnejši vir hrane na svetu (Meng in sod., 2016). Pšenico so začeli gojiti že več kot 10.000 let nazaj tekom neolitske revolucije (Shewry, 2009, cit. po Los in sod., 2019). Zaradi naraščanja človeške populacije je danes vse večja potreba po pridelavi hrane kot so poljščine (Meng in sod., 2016). Velik problem danes pa predstavlja dejstvo, da se tekom procesiranja od 50 do 60 % žitnih zrn zaradi prisotnosti mikroorganizmov in žuželk zavrže (Kumar in Kalita, 2017, cit. po Los in sod., 2020). Največji delež žitnih zrn se zavrže kot posledica kontaminacije z mikroorganizmi na površini semen (Bourke in sod., 2018). Prav tako naj bi bilo na svetu med 25 in 40 % žitnih zrn kontaminiranih z mikotoksini (Bullerman in Bianchini, 2009, Los in sod., 2020). Najbolj nevarni in problematični so predvsem aflatoksini, ki jih proizvajajo glive rodu *Aspergillus* (Sawicka, 2019, cit. po Los in sod., 2020). Uporaba insekticidov in fungicidov je problematična, ker se ti akumulirajo znotraj semen in vodijo v razvoj rezistence tako pri mikroorganizmih kot pri žuželkah. Danes zato opravljajo raziskave na področju razvoja novih fizikalnih metod, ki izboljšajo kaljivost semen, odstranijo mikroorganizme s površine in tako zaobidejo problem nastanka rezistence (Bourke in sod., 2018). Ena od obetavnih metod je obdelava semen s hladno plinsko plazmo (HPP), za katero je bilo že večkrat dokazano, da lahko izboljša kaljivost semen in druge rastne parametre ter zmanjša število mikroorganizmov na površini semen (Mitra in sod. 2013; Jiang in sod., 2014, cit. po Zahoranová in sod., 2016). HPP obravnavamo kot četrto agregatno stanje. Sestavljena je predvsem iz fotonov, ionov, prostih elektronov in tudi atomov (Pankaj in sod., 2007, cit. po Chaple in sod., 2020). HPP je lahko sestavljena tudi iz reaktivnih kisikovih zvrsti, ki so zelo močno oksidacijsko sredstvo in se pogosto uporablja kot način obdelave pšenične moke, saj za seboj ne pušča nobenih sledi (Joye in sod., 2009, cit. po Chaple in sod., 2020).

Za mnogo vrst semen je bilo dokazano, da HPP zmanjša številčnost določenih mikroorganizmov na njihovi površini (Gadri in sod., 2000; Moisan in sod., 2001; Gweon in sod., 2009, cit. po Zahoranová in sod., 2016). Selcuk in sod. (2008) so dokazali, da HPP zmanjša kontaminacijo semen z glivami iz rodu *Aspergillus* in *Penicillium*, ki so vir najbolj problematičnih mikotoksinov na žitnih zrnih (Selcuk in sod., 2008, cit. po Zahoranová in sod., 2016). Park in sod. (2007) so celo dokazali, da HPP lahko neposredno degradira mikotoksine na površini semen (Park in sod., 2007, cit. po Zahoranová in sod., 2016). Poleg zmanjšanja števila mikroorganizmov pri obdelavi semen s HPP pride tudi do spremembe površine semena. Presenetljivo ima to večinoma pozitivne učinke na kalitev. Mnogo raziskav je pokazalo, da obdelava pšeničnih semen z določeno dozo HPP spremeni površino semena (nastanejo razpoke, gube in podobno), kar vodi v povečano absorpcijo vode in posledično hitrejšo in bolj uspešno kalitev (Sera in sod., 2010; Zahoranova in sod. 2016; Li in sod., 2017; Guo in sod., 2018, cit. po Scholtz in sod., 2019).

Namen naše raziskave je bil preveriti vpliv različno dolgih izpostavitvev HPP na kaljivost pšeničnih semen in na številčnost ter raznolikost gliv na površini semen. Iskali smo najbolj optimalno izpostavitvev semen HPP, pri kateri bi odstranili čim več mikroorganizmov iz površine, hkrati pa ohranili zadosten delež kaljivosti semen. Na podlagi do sedaj omenjenih raziskav

pričakujemo, da bo daljša izpostavitvev semen HPP privedla do vse manjšega števila gliv na semenu in posledično do manjšega števila gliv zraslih na PDA (ang. »potato dextrose agar«) ploščah. Medtem pa se bo pri nižjih izpostavitvah kaljivost sprva povečala, pri daljših izpostavitvah pa zmanjšala.

Materiali in metode

Obdelava semen s plazmo

Semena pšenice (*Triticum aestivum*) sorte Bernstein so bila pridobljena od komercialnega ponudnika. Na Inštitutu Jožef Stefan so semena obdelali z hladno plinsko plazmo (HPP). Kot plin so uporabili kisik (O₂) pri tlaku 50 Pa (vakum) in moči 200 W. Semena so HPP izpostavili različno dolgim časovnim obdelavam (0 s, 30 s, 60 s, 90 s in 120 s). Z vsako časovno obdelavo so obdelali 115 semen. Od tega smo 100 semen uporabili za izvedbo kalitvenega testa, preostalih 15 pa za glivne teste.

Kalitveni test

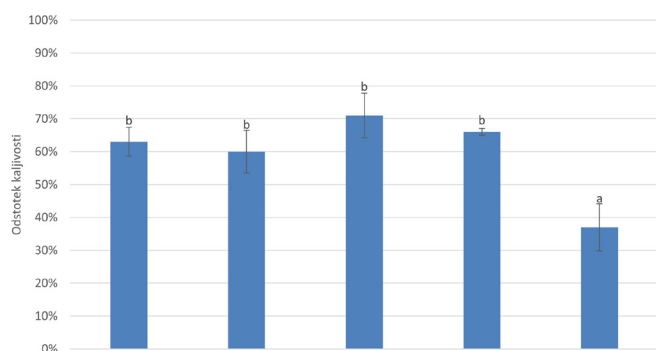
Pri kalitvenem testu smo pripravili petrijevke z navlaženim filter papirjem in v vsako dali po dvajset semen z istim časom izpostavitve HPP. Za vsako izpostavitvev smo naredili 5 paralelnih ponovitev (skupaj 100 semen za vsako izpostavitvev). Pripravili smo tudi pozitivno kontrolo (neobdelana semena). Tako pripravljene petrijevke smo kalili v temi pod kontroliranimi pogoji: 22°C čez dan, 18°C ponoči (v temi) in 60-70% vlažnost. Kalitev smo spremljali po enem, štirih in po sedmih dneh. Grafično smo prikazali kaljivost samo sedmi dan. Izolacija gliv iz semen (kultivacija) in pridobitev čistih kultur Za glivne teste smo pripravili bogata gojišča PDA z dodanim antibiotikom kloramfenikol v koncentraciji 50 µg/mL⁻¹. Za vsako časovno obdelavo smo v petnajstih paralelkah seme sterilno položili na sredino gojišča, petrijevke ovili s plastično folijo in jih dali v škatlo (v temo). Pripravili smo tudi pozitivno kontrolo (neobdelana semena) in negativno kontrolo (semena 10 minut izpostavljena 3% peroksidu (H₂O₂)). Škatlo smo hranili v rastni komori s sobno temperaturo (približno 20°C). Po enem tednu smo ocenili stopnjo rasti gliv in na podlagi morfoloških znakov določili različne morfotipe ter prešteli koliko jih kolonizira posamezno seme. Stopnjo rasti gliv smo izrazili kot odstotek preraščenosti plošče oziroma delež infekcije, ki smo jo določili na podlagi premera glivnih kultur. Vsak posamezni morfotip smo nato precepili na svojo ploščo. Če je bilo le možno smo za vsak morfotip precepili tri paralelke iz različnih plošč. Postopek precepjanja smo ponavljali dokler nam niso zrastle čiste kulture. Ko smo pridobili čiste kulture, smo s pomočjo določevalnega ključa določili, kateri morfotip pripada kateremu rodu (ali vrsti) gliv.

Statistična analiza in prikaz podatkov

Podatke testa kaljivosti in stopnjo rasti smo statistično obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA) in Duncanovim post – hoc testom, $p < 0,05$. To smo naredili s pomočjo programa Statistica 7.0. Ostale izračune in grafične prikaze smo naredili s programom Microsoft Excel.

Rezultati

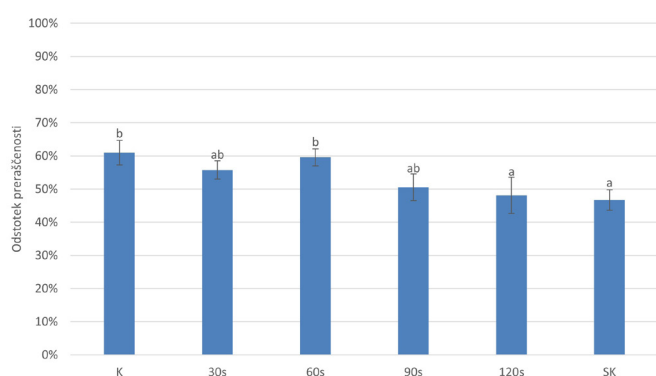
Analiza podatkov z enosmerno analizo variance (ANOVA)



Slika 1: Kaljivost semen pšenice (*Triticum aestivum*) obdelanih s HPP po sedmih dneh inkubacije (povprečje \pm standardna napaka, $n = 15$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med obdelavami (enosmerna ANOVA, Duncanov post – hoc test, $p < 0,05$). Oznake: K – pozitivna kontrola; 15s – 15 sekundna obdelava s HPP; 30s – 30 sekundna obdelava s HPP; 60s – 60 sekundna obdelava s HPP; 90s – 90 sekundna obdelava s HPP; 120s – 120 sekundna obdelava s HPP.

je pokazala, da pri 120 sekundni časovni obdelavi semen s HPP, sedmi dan opazimo statistično značilno manjšo kaljivost. Pri ostalih treh časovnih obdelavah (30 s, 60 s in 90 s) nismo opazili statistično značilno manjše kaljivosti kot pri kontroli (neobdelana semena). Pri 60 sekundni obdelavi je sicer nakazan trend boljše kaljivosti, vendar razlike med 30 sekundno, 60 sekundno in 90 sekundno obdelavo niso statistično značilno različne (Slika 1).

Poleg kaljivosti smo po enem tednu določili tudi stopnjo rasti gliv (odstotek preraščenosti plošče). Pri 120 sekundni časovni obdelavi semen s HPP smo opazili statistično značilno manjšo stopnjo rasti kot pri neobdelanih semenih (kontrola). 60 sekundna časovna obdelava je imela statistično značilno enako stopnjo rasti kot neobdelana semena, medtem ko je imela 120 sekundna časovna obdelava statistično značilno enako stopnjo



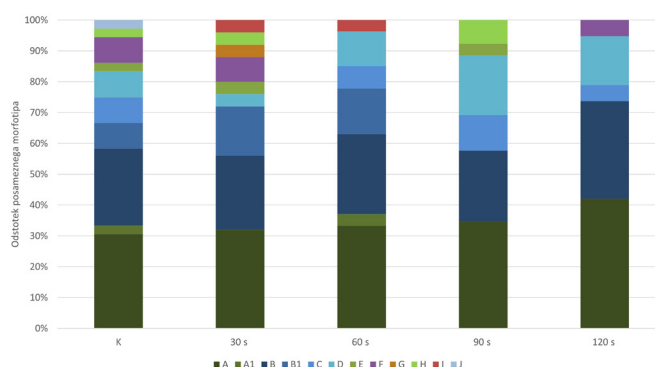
Slika 2: Stopnja rasti gliv na PDA gojišču po sedmih dneh inkubacije (povprečje \pm standardna napaka, $n = 15$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med obdelavami (enosmerna ANOVA, Duncanov post – hoc test, $p < 0,05$). Oznake: K – pozitivna kontrola; 15s – 15 sekundna obdelava s HPP; 30s – 30 sekundna obdelava s HPP; 60s – 60 sekundna obdelava s HPP; 90s – 90 sekundna obdelava s HPP; 120s – 120 sekundna obdelava s HPP; SK – sterilna kontrola.

rasti kot sterilna kontrola (Slika 2). Nobena časovna obdelava ni privedla do popolne sterilizacije semen. Prav tako sterilna kontrola (semena obdelana z H_2O_2) kljub ponovitvi poskusa ni bila brez gliv (semen ni bilo mogoče popolnoma sterilizirati). Poleg zmanjšane stopnje rasti se je pri daljših časovnih obdelavah zmanjšalo tudi število različnih morfotipov (zmanjšala se je diverziteteta). Pri 30 sekundni časovni obdelavi smo na PDA ploščah opazili 9 različnih morfotipov, medtem ko je bilo pri 120 sekundni časovni obdelavi na plošči samo še 5 različnih morfotipov (Slika 3). S pomočjo določevalnega ključa smo ocenili, da so taksonomske vrste morfotipov naslednje: A – *Epicoccum nigrum*; A1 – *Epicoccum nigrum*; B – *Alternaria* sp.; B1 – *Alternaria* sp.; C – *Alternaria* sp.; D – *Alternaria infectoria*; E – *Epicoccum nigrum*; F – *Hannaella zae*; G – neznana vrsta; H – *Epicoccum nigrum*; I – *Botrytis cinerea*; J – *Alternaria infectoria*.

Na sliki 3 vidimo, da so pri nižjih časovnih obdelavah bile prisotne vse našteje vrste gliv. Pri daljših časovnih obdelavah pa so prisotne samo vrste iz rodov *Alternaria* in *Epicoccum*. Pri tem se je povečal predvsem delež vrste *Alternaria infectoria* (morfotip D).

Diskusija

Hladna plinska plazma (HPP) je ena od najbolj obetavnih alternativnih metod za zaviranje rasti mikroorganizmov na površini semen pšenice. Danes se zato opravlja veliko raziskav na področju uporabe HPP za obdelavo pšeničnih semen. Velik problem predstavlja dejstvo, da se rezultati posameznih raziskav med seboj težko primerljivi. Posledično še danes ne poznamo optimalnih pogojev za obdelavo pšeničnih semen, pri katerih bi ohranili dobro kaljivost in seme ustrezno površinsko sterilizirali. Pri raziskavah se namreč uporabljajo različni tipi HPP z različnimi parametri (različni plini, moč, napetost in čas izpostavitve) (Scholtz in sod., 2019). Zaradi tega iz rezultatov raziskav lahko med seboj primerjamo le splošno učinkovitost obdelave. Predvsem pomemben parameter je čas obdelave



Slika 3: Graf glivne diverzitetete pri različnih časovnih obdelavah semen s HPP. Oznake: K – pozitivna kontrola; 15s – 15 sekundna obdelava s HPP; 30s – 30 sekundna obdelava s HPP; 60s – 60 sekundna obdelava s HPP; 90s – 90 sekundna obdelava s HPP; 120s – 120 sekundna obdelava s HPP. Vrste: A – *Epicoccum nigrum*; A1 – *Epicoccum nigrum*; B – *Alternaria* sp.; B1 – *Alternaria* sp.; C – *Alternaria* sp.; D – *Alternaria infectoria*; E – *Epicoccum nigrum*; F – *Hannaella zae*; G – neznana vrsta; H – *Epicoccum nigrum*; I – *Botrytis cinerea*; J – *Alternaria infectoria*.

semena s HPP (Los in sod., 2018). Pri do sedaj objavljenih raziskavah so opazili, da različen čas obdelave pšeničnih semen s HPP različno vpliva na njihovo kaljivost. Rezultati pa si med seboj nekoliko nasprotujejo (Scholtz in sod., 2019). Pri dolgih časovnih obdelavah vsi avtorji poročajo o zmanjšanju kaljivosti, saj pride do poškodb semen. Medtem ko pri krajših časovnih obdelavah nekateri poročajo o izboljšavi kaljivosti, drugi pa ne zaznajo razlike med kontrolnimi in obdelanimi semeni (Los in sod., 2018). Na primer Zahoranová in sod. (2016) so pri obdelavi pšeničnih semen s HPP (parametri: atmosferski tlak, zrak, 20 kV, 14 kHz) pri 20 in 50 sekundi izpostavitev opazili statistično značilno večjo kaljivost kot pri neobdelanih semenih, medtem ko Dobrin in sod. (2015) pri obdelavi pšeničnih semen s HPP (parametri: atmosferski tlak, zrak, 15 kV, 50 kHz) pri nobeni izpostavitvi niso opazili statistično značilne večje kaljivosti. Enako tudi mi pri nižjih časovnih obdelavah nismo opazili statistično značilnega povečanja kaljivosti. Pri 60 s obdelavi se sicer nakazuje trend boljše kaljivosti, vendar razlika ni statistično značilna. Pri daljših časovnih obdelavah (120 sekund) pa smo opazili statistično značilno manjšo kaljivost pšeničnih semen. Mehanizem s katerim naj bi HPP vplivala na kaljivost semen še danes ni popolnoma pojasnjen. Semena so namreč izredno kompleksen sistem in posledično HPP na njih vpliva na več različnih načinov (Filatova in sod., 2013, cit. po Dobrin in sod., 2015). Veliko avtorjev poroča, da obdelava semen s HPP vodi v spremembo površine pšeničnih semen (Dhayal in sod., 2006; Sera in sod., 2008; Filatova in sod., 2013, cit. po Dobrin in sod., 2015), kar lahko vodi v povečanje privzema kisika in vode in posledično vpliva na kaljivost semen (Dhayal in sod., 2006; Bormashenko in sod., 2012, cit. po Dobrin in sod., 2015). Obdelava semen s HPP je obetavna alternativna metoda dekontaminacije semen, saj do sedaj še pri nobenem mikroorganizmu niso odkrili razvoja rezistence po obdelavi (Zimmermann, 2012; Matthes in sod., 2014, Brun in sod., 2015, cit. po Los in sod., 2020). HPP iz površine semen odstrani tako bakterije kot glive (Los in sod., 2020). Antimikrobni učinki HPP so posledica radikalov, kot so reaktivne kisikove vrzti (ROS), ki poškodujejo proteine in nukleinske kisline ter tvorijo lezije v celični membrani (Laroussi in Leipold, 2004; Scholtz in sod., 2015; cit. po Los in sod., 2018). Različne vrste gliv pa so različno občutljive na obdelavo s HPP. Rezultati raziskav nakazujejo na to da so glive, ki tvorijo spore bolj odporne na obdelavo s HPP (Scholtz in sod., 2015; Soušková in sod., 2012, cit. po Sakudo in sod., 2019). Vse do sedaj raziskane glive so vsaj do neke mere občutljive na obdelavo s HPP. Los in sod. (2018) so pokazali, da izpostavitve pšeničnih semen HPP vodi v zmanjšanje celokupnega števila gliv na površini semen. Do enakih rezultatov so prišli tudi Zahoranová in sod. (2016), ter mnogo drugih avtorjev. Daljša kot je časovna obdelava pšeničnih semen s HPP, manjše bo celokupno število gliv na površini semen. Do podobnih rezultatov smo prišli tudi mi. Pri najdaljši časovni obdelavi (120 s) smo opazili statistično značilno manjšo stopnjo rasti gliv, kot pri neobdelanih semenih, kar nakazuje na manjše število gliv na površini obdelanih semen. Najdaljša časovna obdelava (120 s) ima stopnjo rasti gliv statistično značilno enako kot sterilna kontrola. Ti dve obdelavi semen imata tako primerljiv učinek na stopnjo rasti gliv. Do tega je najverjetneje prišlo, saj so pšenična semena polna glivnih endofitov, ki jih tudi z klasično sterilizacijo ne moremo odstraniti. Poleg časa obdelave pa

na uspešnosti dekontaminacije lahko vpliva tudi nagubanost semen. Pšenična semena so polna gub in por, kar glivam omogoča bolj uspešno pritrditev na semena in obdelava semen s HPP je zato manj učinkovita (Brasoveanu in sod., 2015, cit. po Los in sod., 2018).

Na površini pšeničnih semen najdemo veliko različnih taksonov gliv, kot so *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* in vsaj 25 drugih skupin filamentoznih gliv (Duan in sod., 2007; Wachowska in sod., 2013, cit. po Zahoranová in sod., 2016). Los in sod. (2020) so s sekvenciranjem dokazali, da od 98 do 100% gliv na pšeničnih semenih sodi pod deblo Ascomycota. Med njimi od 82 do 94% gliv sodi v razred Dothideomycetes in kar 97% teh gliv sodi pod rod *Alternaria*. Ko so semena obdelali s HPP so opazili upad gliv debela Ascomycota. Podobne skupine gliv so na pšeničnih semenih odkrili tudi Muthomi in sod. (2008). Glavni rodovi, ki so jih zaznali so bili *Epicoccum*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* in *Penicillium*. Do podobnih rezultatov pa smo prišli tudi mi. Na semenih so namreč močno prevladovale glive iz rodov *Epicoccum* in *Alternaria* (oba sodita pod razred Dothideomycetes). Kot že omenjeno so različne skupine gliv različno občutljive na obdelavo s HPP zato smo po obdelavi opazili tudi spremembe v diverziteti gliv. Pri najdaljši časovni obdelavi (120 s) na semenih nismo več zaznali vrste *Botrytis cinerea* kar nakazuje na večjo občutljivost rodu na obdelavo s HPP. Delež vrste *Alternaria infectoria*, pa se je pri daljših obdelavah relativno povečal, kar nakazuje na večjo odpornost rodu *Alternaria* na obdelavo s HPP.

Zaključki

Na podlagi rezultatov raziskave lahko potrdimo hipotezo, da pri daljših izpostavitvah semen HPP pride do zmanjšanja kaljivosti, ne moremo pa potrditi hipoteze, da se pri nižjih izpostavitvah kaljivost poveča, saj rezultati niso bili statistično značilno različni. Potrdili smo tudi, da daljše časovne obdelave vodijo v manjšo stopnjo rasti gliv. Pri najdaljši časovni obdelavi (120 s) smo opazili statistično značilno manjšo stopnjo rasti kot pri neobdelanih semenih. Poleg tega pa je bila najdaljša časovna obdelava primerljiva s kontrolo sterilizirano s 3% H₂O₂, kar nakazuje na enako učinkovitost teh dveh načinov obdelave. Poleg znižanja stopnje rasti gliv smo potrdili tudi, da daljše časovne obdelave vodijo v znižanje diverzitet glivne združbe pšeničnih semen.

Literatura

1. Bourke P., Ziuzina D., Boehm D., Cullen P.J., Keener K. 2018. The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production. Trends in Biotechnology, Volume 36, Issue 6, June 2018, Pages 615-626
2. Chaple S., Sarangapani C., Jones J., Carey E., Causeret L., Genson A., Duffy B., Bourke P. 2020. Effect of atmospheric cold plasma on the functional properties of whole wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and wheat flour. Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 66, December 2020, 102529
3. Dobrin D., Magureanu M., Mandache N. B., Ionita, M. 2015. The effect of non-thermal plasma treatment on wheat germination and early growth. Innovative food science & emerging technologies, 29, 255-260.
4. 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 Res Int. 2018 Apr;106:509-

- 521.
5. Los A., Ziuzina D., Boehm D., Cullen P.J., Bourke P. 2019. Investigation of mechanisms involved in germination enhancement of wheat (*Triticum aestivum*) by cold plasma: effects on seed surface chemistry and characteristics. *Plasma Process Polym* 16:e1800148
6. Los A., Ziuzina D., Boehm D., Bourke P. 2020. Effects of cold plasma on wheat grain microbiome and antimicrobial efficacy against challenge pathogens and their resistance. *International Journal of Food Microbiology* 335 (2020) 108889
7. Meng Y., Qu G., Wang T., Sun Q., Liang D., Hu S. 2017. Enhancement of Germination and Seedling Growth of Wheat Seed Using Dielectric Barrier Discharge Plasma with Various Gas Sources. *Plasma Chem Plasma Process* 37, 1105–1119 (2017).
8. Muthomi J.W., Ndung'u J.K., Gathumbi J.K., Mutitu E.W., Wagacha J.M. 2008. The occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Kenyan wheat. *Crop Protection* (Guildford, Surrey) 27(8):1215-19.
9. Sakudo A., Yagyu Y., in Onodera, T. 2019. Disinfection and Sterilization Using Plasma Technology: Fundamentals and Future Perspectives for Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 20(20), 5216.
10. Scholtz V., Šerá B., Khun J., Šerý M., Julák J. 2019. Effects of Nonthermal Plasma on Wheat Grains and Products. *J. Food Qual.* 2019, 2019, 7917825.
11. Zahoranová A., Henselová M., Hudecová D., Kaliňáková B., Kováčik D., Medvecká V., Černák 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 (2016).