

2022 Vol. 13 Št. 1

C S P P

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum



Zgodba iz naslovnice



Slika: Paula Pongrac

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum
Zbornik študentov fiziologije rastlin

Izdajata: Katedra za botaniko in 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: 2022

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

- 4 MEDSEBOJNE INTERAKCIJE GLIVNIH ENDOFITOV IN NJIHOV VPLIV NA KALITEV SEMEN NAVADNE AJDE (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*)**
Kristina Andrejc, Veronika Bukvič, Amadej Jelenič, Jona Novljan
- 10 MEDSEBOJNE INTERAKCIJE GLIVNIH ENDOFITOV IN NJIHOV VPLIV NA KALITEV SEMEN TATARSKE AJDE (*FAGOPYRUM TATARICUM*)**
Primož Fabjan, Ana Kolenc, Ana Rupar, Rebeka Udvarc
- 15 BIOFORTIFIKACIJA KALIC SOJE S CINKOM**
Katarina Hrovat, Nika Paternost, Neža Škofljanc, Nika Tivadar
- 19 BIOFORTIFIKACIJA KALIC OLJNE OGRŠČICE S CINKOM**
Ajda Dešman, Tina Telban Stoilković, Tjaša Šentjunc, Bronja Vencelj Merc
- 24 BIOFORTIFIKACIJA KALIC PROSA S CINKOM**
Eva Cerkvenc, Tara Fabčič, Katarina Šilc, Alenka Vesel
- 29 BIOFORTIFIKACIJA KALIC JEČMENA S CINKOM**
Tanja Kobal¹, Nika Kozoderc², Irina Modrušan², Luka Žeželj²
- 34 UČINEK EKSTRAKTA IZ SEMEN TATARSKE AJDE (*FAGOPYRUM TATARICUM*) NA RAST IZBRANIH VRST GLIV**
Natalija Pavlinjek, Neža Praček, Katja Stanovšek, Samuel Žvanut
- 39 UČINEK EKSTRAKTA IZ SEMEN NAVADNE AJDE (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*) NA RAST IZBRANIH GLIV**
Marija Kravanja, Monika Širca, Ana Skledar, Danijela Herga
- 44 VPLIV HLADNE PLAZME NA KALJIVOST IN DEKONTAMINACIJO SEMEN TATARSKE AJDE (*FAGOPYRUM TATARICUM GAERTN.*)**
Ravnjak Tim, Štepihar Denis, Tavčar Kunstič Tajda, Vukovič Alen
- 50 VPLIV HLADNE PLAZME NA KALJIVOST IN DEKONTAMINACIJO SEMEN NAVADNE AJDE (*FAGOPYRUM ESCULENTUM MOENCH*)**
Bohar Zala, Cvetkovska Janina, Deurič Jana, Požun Nika

Medsebojne interakcije glivnih endofitov in njihov vpliv na kalitev semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*)

Kristina Andrejc, Veronika Bukvič, Amadej Jelenič, Jona Novljan

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- V članku smo preverili vpliv dveh sevov *Epicoccum nigrum* na rast več različnih fitopatogenih gliv za namen bionadzora. Prav tako smo preverjali vpliv okužbe semen navadne ajde z različnimi filamentoznimi glivami na kalitev in rast kalic, ter vpliv na količino fenolov v kalicah.
- Izvedli smo antagonistične teste na agarnih ploščah, teste vpliva okužbe z glivami na kalitev in rast kalic z inkubacijo semen navadne ter tem kalicam določili vsebnost skupnih fenolov.
- Po 14 dnevih inkubacije je *E. nigrum* statistično značilno zmanjšala rast glive *Alternaria alternata* in sicer v povprečju za 28,6 %. Pri okužbi semen navadne ajde z različnimi glivami, nikjer nismo opazili večjega deleža kalitve semen ali izboljšanja rasti kalic navadne ajde. Opazili pa smo različno močno zaviranje kalitve semen in rasti kalic navadne ajde s strani *B. cinerea*, *F. fujikuroi* SC in *F. graminearum*. Vsebnost skupnih fenolov je povečala gliva *E. nigrum* DARK, medtem ko jih je okužba z ostalimi glivami zmanjšala.
- Gliva *E. nigrum* ima potencialno zanimive lastnosti za bionadzor glive *A. alternata*, vendar pa v našem eksperimentu nismo dokazali pozitivnih vplivov na kalitev semen navadne ajde ali vsebnost fenolov.

Ključne besede: bionadzor, fitopatogene glive, polifenoli, *Epicoccum nigrum*

Uvod

Hitra rast populacije predstavlja velik izziv za kmetijstvo. Da bi zadostila rastočim prehranskim potrebam, bi se svetovna pridelava hrane morala povečati za 60 % do leta 2050 (Alexandratos & Bruinsma, 2012). Zatiranje škodljivcev in posledično zmanjševanje izgub pridelka predstavlja enega od večjih izzivov na tem področju (Oerke, 2006). Vedno bolj jasno postaja tudi dejstvo, da intenzivno kmetijstvo z uporabo sintetičnih gnojil in sredstev proti škodljivcem negativno vpliva na kvaliteto tal, onesnaženje voda in človeško zdravje (Carpenter s sod., 1998; Cassman s sod., 2002; Chowdhury s sod., 2008; Kim s sod., 1997).

Glive sodijo med najpomembnejše rastlinske patogene, na svetovni ravni povzročijo kar 30% vseh izgub pridelka (Fisher in sod., 2018). Glivi *Botrytis cinerea* in *Fusarium graminearum* sodita med najpomembnejše glivne fitopatogene (Dean in sod., 2012). Gliva *B. cinerea* povzroči 10-100 mrd dolarjev škode na leto (Weiberg in sod., 2013). Trenutno se za zatiranje škodljivcev uporabljajo predvsem kemična sredstva, ki pa so škodljiva za zdravje in okolje ter vodijo do razvoja sevov škodljivcev, ki so odporni na fungicide (Droby s sod., 2009). Iz tega razloga je vedno več raziskav na področju razvoja t.i. »mikrobnih sredstev biološkega nadzora (MBCA)«, z uporabo katerih bi se lahko izognili določenim negativnim lastnostim uporabe kemičnih fungicidov (Köhl in sod., 2011, 2019). Gre za uporabo mikroorganizmov, ki z direktnim antagonizmom patogenov, proizvodnjo antimikrobnih učinkovin ali izboljšanjem rastlinskih obrambnih mehanizmov pomagajo pri obvladovanju rastlinskih bolezni (Köhl in sod., 2019).

V pričujoči raziskavi smo želeli ovrednotiti vpliv, ki ga imajo glivni patogeni *Alternaria alternata*, *F. graminearum*, *Fusarium fujikuroi* SC in *B. cinerea* na kalitev semen navadne ajde in proizvodnjo sekundarnih metabolitov ter odkriti potencialne antagonistične odnose med glivama *Epicoccum nigrum* in *Epicoccum nigrum* DARK (črni izolat iste vrste) ter navedenimi patogeni. Naša hipoteza je, da bosta glivi iz rodu *Epicoccum* zavirali rast izbranih patogenih glivnih vrst in izboljšali kalitev ter rast kalic. Predpostavili smo tudi, da bodo izbrane patogene glivne vrste zavirale kalitev in rast kalic ter povišale vsebnost skupnih fenolov.

Materiali in metode

Rastlinski material

Semena navadne ajde so bila pridobljena na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani (vir: Mlin Rangus, Šentjernej, Slovenija).

Sevi gliv

Uporabljali smo glivne vrste *E. nigrum* in *E. nigrum* DARK, *A. alternata*, *F. graminearum*, *F. fujikuroi* SC in *B. cinerea*. Za uporabo v eksperimentih so bile gojene na krompirjevih dekstroznih agarjskih (PDA) ploščah pri 24 °C in 60% vlažnosti, v temi.

Antagonistični testi

Za vsako od dveh gliv v posameznem antagonističnem testu smo izrezali košček iz agarja velikosti 5 x 5 mm, na katerem je rastla. Izsečka smo postavili na ploščo s svežim gojiščem PDA

na medsebojni razdalji 5 cm. Uporabljene so bile kombinacije *E. nigrum* proti *A. alternata*, *F. graminearum*, *F. fujikuroi* SC in *B. cinerea* ter *E. nigrum* DARK proti istim glivam. Za kontrolo smo uporabili izsečka iste glive. Plošče so bile inkubirane v rastni komori pri temperaturi 24°C in 60% vlažnosti, v temi. Merili smo polmer glivne rasti od sredine izsečka do roba rasti glive na gojišču v smeri proti nasproti ležečemu izsečku druge glive 7. in 14. dan po vzpostavitvi testa. Izmerjene vrednosti smo normalizirali glede na povprečne izmerjene vrednosti kontrol vsake glive. Tako pridobljene deleže rasti smo predstavili na grafu z izraženo rastjo v odstotkih.

Vpliv okužbe semen navadne ajde z glivami na kalitev Primerjali smo vpliv okužbe z različnimi glivami na delež vzkaljenih semen navadne ajde in dolžino kalic. Za test smo vzeli izseček agarja, na katerem je rastla preučevana gliva in ga postavili na sredino plošče s svežim PDA gojiščem in ploščo inkubirali 5-7 dni pri zgoraj navedenih pogojih, tako da je gliva prerastla približno polovico plošče. Nato smo na rob micelija v enakomerni razdalji postavili semena. Za vsako ploščo z glivo smo dali po 10 semen v 5 ponovitvah za vsako glivno vrsto. Za kontrolo smo vzeli agar brez glive. Plošče so bile inkubirane v temi pri zgoraj navedenih pogojih. Za vzkaljena semena smo vzeli tista, pri katerih je vidno vzklila radikula (koreninica). Spremljali smo delež vzkaljenih semen drugi, tretji in deseti dan po vzpostavitvi testa. Deseti dan smo izmerili dolžino kalic. Vpliv okužbe z glivami na sekundarni metabolizem kalic Spremljali smo koncentracijo skupnih fenolov v kalicah po Folin-Ciocalteu metodi (Kreft in sod., 2013). Ekstrakt smo pridobili tako, da smo 200 mg prahu kalic ajde dodali 10 mL 60% etanola in stresali na stresalniku preko noči. Ekstrakt smo centrifugirali pri 2000 g 10 minut, ter uporabili tako pridobljeni supernatant. 100 µL ekstrakta (supernatanta) smo dodali 750 µL destilirane vode in 50 µL Folin-Ciocalteu (FC) reagenta ter po treh minutah še 100 µL 20% Na₂CO₃. Pri slepem vzorcu smo namesto FC reagenta uporabili dH₂O. Vzorce smo 60 minut inkubirali v temi ter nato izmerili absorbanco pri 750 nm. Za standard smo uporabili koncentracijsko vrsto katehola.

Tabela 1: Povprečni premer kontrolnih gliv po 7. in po 14. dneh s standardnim odklonom v milimetrih (mm).

Gliva	Rast po 7. dneh (mm)	Rast po 14. dneh (mm)
<i>Epicoccum nigrum</i> (n = 8)	22,5 ± 2,0	23,6 ± 1,7
<i>Epicoccum nigrum</i> DARK (n = 10)	18,7 ± 1,5	21,8 ± 2,1
<i>Fusarium graminearum</i> (n = 10)	21,9 ± 1,6	23,9 ± 1,8
<i>Fusarium fujikuroi</i> SC (n = 10)	23,0 ± 0,8	24,6 ± 1,3
<i>Botrytis cinerea</i> (n = 10)	22,0 ± 1,6	23,8 ± 3,0
<i>Alternaria alternata</i> (n = 8)	21,3 ± 4,2	23,6 ± 3,8

Statistična analiza

Rezultate smo prikazali na grafih v programu Statistica ter jih obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA) s Tukeyevim testom HSD (razlike so statistično pomembne pri $p < 0,05$) v programu Statistica.

Rezultati

Antagonistični testi

V spodnji tabeli (Tabela 1) so prikazana povprečja premerov kontrolnih gliv, na podlagi katerih smo ocenjevali rast gliv v antagonističnih testih.

V tabeli 2 so prikazani povprečni premeri patogenih gliv po 7. in po 14. dneh inkubacije z glivama *E. nigrum* DARK in *E. nigrum*. Rezultati po 14 dneh inkubacije so predstavljeni na sliki 1.

Po 7. dneh inkubacije z glivo *E. nigrum* DARK ni bila inhibirana rast nobene izmed patogenih gliv. Po 7. dneh je bila statistično značilno povečana le rast *F. graminearum* (Tabela 2). Na sliki 1A vidimo, da po 14. dneh inkubacije z *E. nigrum* DARK ni bila zavrta rast nobene izmed patogenih gliv. Smo pa opazili statistično značilno različno rast pri *F. graminearum*, *F. fujikuroi* SC in *B. cinerea*, medtem, ko *E. nigrum* DARK po 14. dneh na rast glive *A. alternata* ni imela statistično značilnega vpliva.

Tabela 2: Povprečni premer patogenih gliv s standardnim odklonom v milimetrih (mm), po 7. in 14. dneh inkubacije v kombinaciji z *Epicoccum nigrum* DARK (END) in *Epicoccum nigrum* (EN). Pomen oznak glivnih vrst v tabeli: FG - *F. graminearum*, FF - *F. fujikuroi* SC, BC - *B. cinerea* in AA - *A. alternata*. * označuje statistično značilne razlike v rastli posamezne patogene glive v antagonističnem testu z EN oziroma END, glede na kontrolno skupino posamezne patogene glive.

Gliva v kombinaciji (x)	Rast po 7. dneh (mm)	Rast po 14. dneh (mm)
FG x END (n = 8)	27,1* ± 2,5	26,6* ± 1,5
FF x END (n = 8)	22,0 ± 1,6	26,6* ± 1,9
BC x END (n = 8)	23,8 ± 1,1	29,3* ± 1,2
AA x END (n = 8)	19,4 ± 3,4	22,5 ± 3,5
FG x EN (n = 7)	21,4 ± 3,1	22,3 ± 4,1
FF x EN (n = 8)	20,3* ± 1,9	23,3 ± 1,6
BC x EN (n = 8)	20,0* ± 1,9	21,3 ± 2,4
AA x EN (n = 8)	16,8* ± 2,4	16,9* ± 2,4

Gliva *E. nigrum* je po 7. dneh zavirala rast *F. fujikuroi* SC, *B. cinerea* in *A. Alternata* (Tabela 2). Iz slike 1B je razvidno, da je po 14. dneh inkubacije z *E. nigrum* bila v primerjavi s kontrolo statistično značilno zmanjšana le rast glive *A. alternata* in sicer v povprečju za 28,6 %. Na rast ostalih izbranih patogenih glivnih vrst po 14. dneh inkubacije *E. nigrum* ni imela statistično značilnega vpliva.

Vpliv okužbe semen navadne ajde z glivami na kalitev in rast kalic

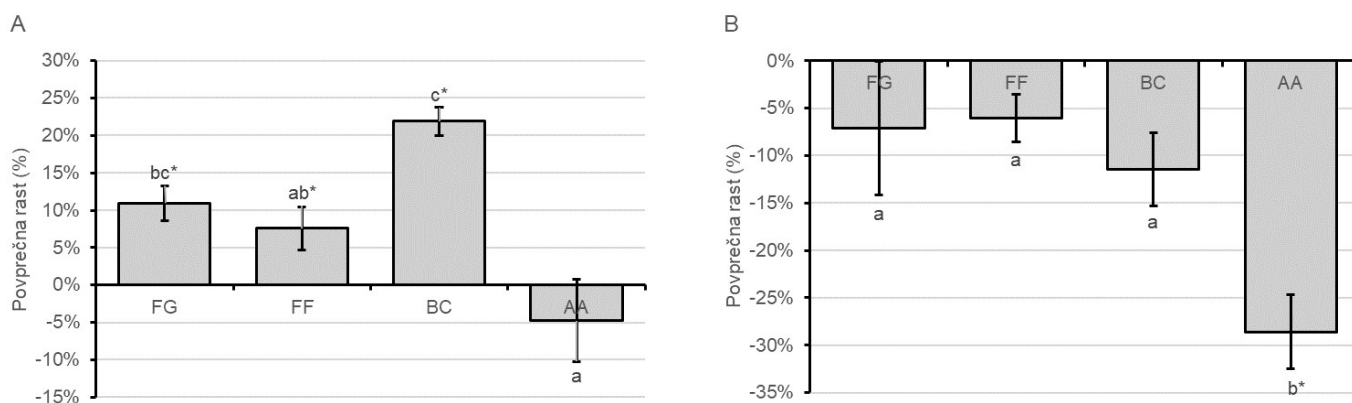
Okužba semen navadne ajde z glivo lahko vpliva tako na kalitev semen, kot tudi na nadaljnjo rast kalic. Delež kalitve semen se je gibal od 4 % pri kalitvi ob okužbi z glivo *F. graminearum* do 86 % pri kontroli brez glive (Slika 2A). Dolžina kalic pa se je gibala od 3 mm pri kalitvi z glivo *F. graminearum* do 41 mm pri *E. nigrum* DARK. Pri okužbi semen z različnimi glivami, nikjer nismo opazili izboljšanja rasti kalic ali večjega deleža kalitve semen. Zabeležili pa smo različno močno zaviranje rasti kalitve semen in rasti kalic s strani gliv *F. fujikuroi* SC in *F. graminearum* (Slika 2B). Najvišje zaviranje kalitve semen in rasti kalic smo opazili pri glivi *F. graminearum*.

Vpliv okužbe z glivami na sekundarni metabolizem kalic

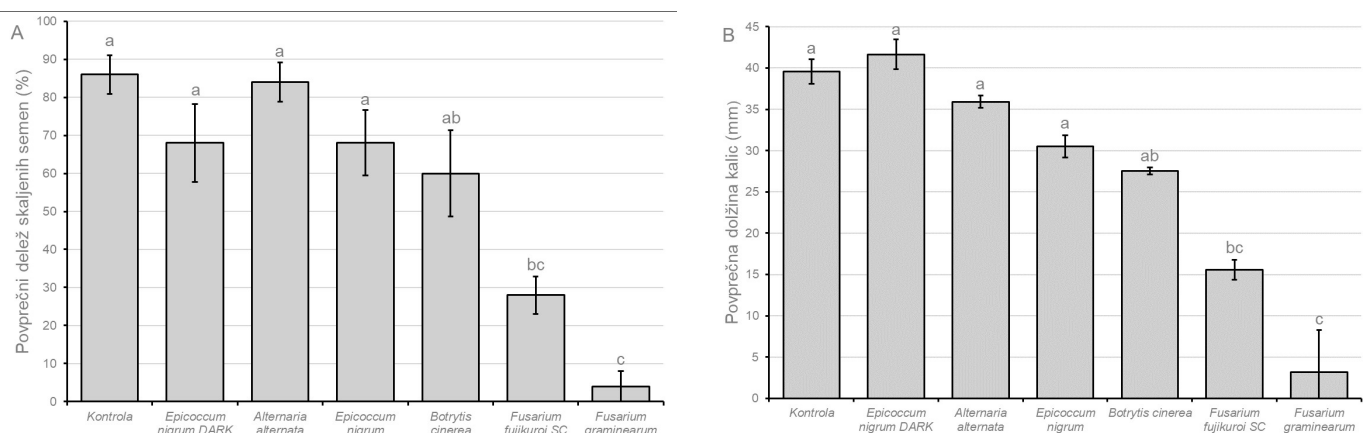
Fenoli so bili zaznani v vseh testiranih kalicah in so se gibali od 0,3 - 0,7 % suhe mase. Okužba s patogenimi glivami *Botrytis cinerea*, *Fusarium fujikuroi* SC in *Epicoccum nigrum* je zmanjšala delež polifenolov v kalicah (Slika 3). Najbolj jih je zmanjšala okužba z glivo *F. fujikuroi* SC v primerjavi s kontrolo. Kalice okužene s *Fusarium graminearum* niso bile dovolj velike za izvedbo določanja koncentracij fenolov.

Diskusija

Antagonistične interakcije v ekosistemih označujejo povezave, kjer ima en organizem od vzpostavitve interakcije korist, drugi pa škodo. Pri interakcijah gliv z glivami lahko pride do antagonističnega vedenja pred vzpostavitvijo fizičnega kontakta (npr. z hlapnimi in difuzibilnimi snovmi) ali po vzpostavitvi le-tega, ko lahko pride do različnih oblik mikoparazitizma (Watkinson in sod. 2015). *Epicoccum* spp. lahko inhibira rast in kalitev konidijev številnih glivnih fitopatogenov in je raziskovan kot potencialna biokontrola proti tem organizmom (Braga in sod., 2018). V našem poskusu je *E. nigrum* bolj uspešno inhibiral različne vrste gliv kot *E. nigrum* DARK, torej črn izolat iste vrste. To razliko bi lahko pripisali različnemu naboru sekundarnih metabolitov, ki jih seva proizvajata (Braga in sod. 2018). Gliva *E. nigrum* je po 14 dneh zaviral rast glive *A. alternata*. Po naših podatkih, v literaturi še ni bilo moč zaslediti takšne interakcije antagonizma. Z namenom inhibicije širjenja *A. alternata* se raziskave namreč osredotočajo predvsem na bakterijske izolate *Bacillus* spp. ter glivne izolate *Trichoderma* (Tozlu in sod. 2018; Tekiner in sod. 2020). Ko-kultivacija sevov *E. nigrum* z vrstami iz rodu *Fusarium* v našem poskusu ni prinesla opaznega antagonizma. Abdallah in sod. (2018) pa so v in vitro in in planta pogojih pokazali, da lahko *E. nigrum* uspešno tekmuje proti *F. graminearum*, saj lahko ko-kultivacija z *E. nigrum* uspešno zmanjša količino toksinov, ki jih producira *F. graminearum*. Do podobnih zaključkov so prišli tudi Jensen in sod. (2016), saj so pokazali, da prisotnost *E. nigrum* po 14. dnevih zmanjša rast micelija *F. graminearum* v



Slika 1: Povprečna rast patogenih gliv s pripadajočimi standardnimi napakami ($n = 8$, razen pri FG x EN je $n = 7$) v deležih od kontrole posamezne glive po 14 dneh inkubacije, v kombinaciji z glivo *E. nigrum* DARK (graf A) in *E. nigrum* (graf B). FG - *F. graminearum*, FF - *F. fujikuroi* SC, BC - *B. cinerea* in AA - *A. alternata*. S simbolom * so označene statistično značilne razlike v rasti posamezne glive (med kontrolno skupino in glivo v antagonističnem testu za posamezno vrsto), medtem ko različne črke označujejo statistično značilne razlike v rasti med posameznimi patogenimi glivnimi vrstami.

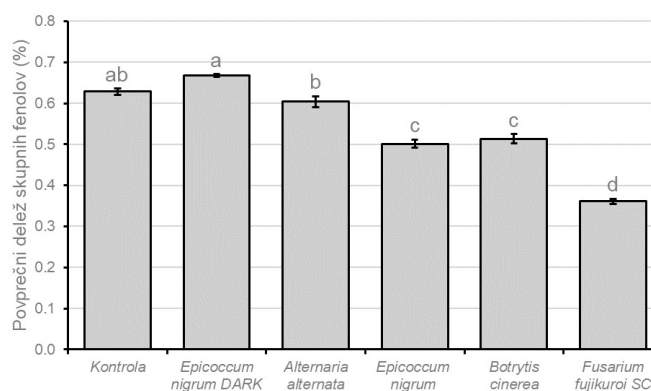


Slika 2: Povprečni delež skaljenih semen (%) (graf A) ($n = 50$) in povprečne dolžine kalic (mm) (graf B) s pripadajočo standardno napako ob inkubaciji z različnimi filamentoznimi glivami.

in vitro pogojih na pšenici. V našem poskusu *E. nigrum* DARK ni zavrla rasti *B. cinerea*, ampak je slednja celo prerastla prvo, kar je v skladu z Ogorek in Plaskowska (2016), ki sta pokazala, da *B. cinerea* po 10. dneh ko-kultivacije limitira rast *E. nigrum*.

Naš poskus je pokazal, da sta vrsti iz rodu *Fusarium* inhibirali kalitev semen navadne ajde in rast kalic, preostale vrste gliv pa niso izkazale vpliva na kalitev in rast kalic v primerjavi s kontrolami. Vrste rodu *Fusarium* proizvajajo pester nabor različnih kemičnih fitotoksičnih spojin, ki lahko vplivajo na številne biološke aktivnosti in povzročajo morfološke, fiziološke in metabolne spremembe (kot so npr. nekroze, kloroze, inhibicija rasti, venenje, inhibicija kalitve semen navadne ajde). Gliva *F. fujikuroi* proizvaja fuzarično kislino, vplivi katere se na rastline v strupenih koncentracijah izražajo kot spremembe v permeabilnosti celičnih membran, zmanjšanje mitohondrijske aktivnosti, inhibicija sinteze ATP in inhibicija rasti korenin.

Vrsta *F. graminearum* najpogosteje sintetizira mikotoksine kot so zearalenon (ZEA, imenovan tudi F-2 toksin) in trihoteceni (nivalenol (NIV), deoksinivalenol (DON), 3-acetildeoksinivalenol (3-ADON), 15-acetildeoksinivalenol (15-ADON) in diacetoksiscirpenol (DAS, imenovan tudi anguin)) (Ismail in Papenbrock 2015). Raziskave so pokazale, da je npr. DON pri pšenici v koncentraciji 50 $\mu\text{g/ml}$ popolnoma inhibiral kalitev pšeničnih semen, v koncentraciji 10-25 $\mu\text{g/ml}$ pa je značilno



Slika 3: Povprečni delež skupnih fenolov v suhi masi kalic (%) s pripadajočo statistično napako ob inkubaciji z različnimi filamentoznimi glivami ($n = 40$).

zmanjšal rast mladih rastlin (Bandurska s sod. 1994). Za DAS so poročali, da je pri koncentraciji 5 mg/L zaviral preživetje sejancev: 62 % pri ječmenu, 58 % pri pšenici in 39 % pri sireku (Hasan 1999). Za *A. alternata* je bilo poročano, da povzroči 50 % zavrtje preživetja sejancev pri ječmenu pri koncentraciji 79 mg/L, pšenici 316 mg/L in sireku 550 mg/L (Hasan 1999). Gliva *A. alternata* RSF-6L, izolirana iz listov pasjega zelišča (lat.

Solanum nigrum) je sintetizirala snovi, ki so izboljšale rast riža. Tretiranje s filtrati glivne kulture je namreč povečalo biomaso rastlin v primerjavi s kontrolo. Izkazalo se je, da je to tretiranje imelo podoben učinek kot eksogena aplikacija IAA (indol-3-ocetne kisline) (Khan s sod. 2015).

Polifenolne spojine so heterogena skupina rastlinskih sekundarnih metabolitov, ki jih delimo na fenolne kisline, flavonoide, stilbene, lignane ter ostalo (Belščak-Cvitanović in sod, 2018). Funkcije fenolnih spojin v rastlinah so raznolike, od sodelovanja pri rasti in razvoju (zadebelitev celične stene, produkcija hormonov, pigmentacija), razmnoževanju rastlin (pigmentacija, okus in zaščita sadežev) in obrambnih mehanizmih proti stresorjem (UV svetloba, herbivori, mikroorganizmi) (Wallis in Galarneau, 2020). V literaturi se pojavljajo različni podatki o količini skupnih polifenolov prisotnih v navadni ajdi (od 912 µg/g suhe teže (0,09 % suhe teže) (Gorinstein in sod, 2007) do 3891 mg/kg suhe teže (0,39 % suhe teže) (Podolska in sod, 2021)). V našem poskusu so se vrednosti skupnih fenolov po inkubaciji semen navadne ajde z različnimi vrstami gliv gibale med 0,3 % in 0,7 % suhe mase. Od kontrole so se razlikovali vzorci inokulirani z *E. nigrum*, *B. cinerea* in *F. fujikuroi* SC. Zmanjšanje polifenolov v teh vzorcih bi lahko pripisali glivnim mehanizmom, ki do neke mere aktivno znižajo fenolno produkcijo (Shalaby in Horwitz, 2014). Wallis in Galarneau (2020) sta v meta-analizi raziskovala trende fenolne indukcije v rastlinah po interakcijah z mikroorganizmi. Analiza izbranih virov je pokazala, da je kolonizacija rastlin s koristnimi glivami povzročila značilno fenolno indukcijo, medtem ko pri kolonizaciji s patogenimi glivami ta sprememba ni bila opazna (Wallis in Galarneau, 2020).

Zaključki

S poskusom smo želeli pokazati ali bi lahko glivo *E. nigrum* uporabili kot sredstvo za bionadzor izbranih fitopatogenih gliv (*A. alternata*, *B. cinerea*, *F. graminearum* in *F. fujikuroi*). Gliva *E. nigrum* je izkazala najbolj izrazito antagonistično delovanje na rast glive *A. alternata*. S kalitvenimi testi pri semenih navadne ajde ni bilo opaženega izboljšanja kalitve ali rasti kalic, sta se pa vrsti rodu *Fusarium* izkazali za najbolj patogeni, saj sta najbolj izrazito zavrli kalitev in rast kalic v primerjavi s kontrolo. To zavrte je mogoče pripisati pestremu naboru mikotoksinov, ki jih vrsti lahko potencialno sintetizirata. Pri analizi skupnih fenolov ni bilo opaženega povišanja, kar bi sicer lahko pričakovali, saj so to sekundarni metaboliti, ki jih rastlina uporablja kot obrambo pred stresom.

Literatura

- Abdallah MF, Boevre MD, Landschoot S, Saeger SD, Haesaert G, Audenaert K, 2018. Fungal endophytes control *Fusarium graminearum* and reduce trichothecenes and zearalenone in maize. *Toxins*, 10, 493, doi: 10.3390/toxins10120493: 18 str.
- Alexandratos N, Bruinsma J, 2012. WORLD AGRICULTURE TOWARDS 2030 / 2050 The 2012 Revision PROOF COPY. ESA Working paper, 12, 12: 146
- Bandurska H, Chelkowski J, Wisniewska H, 1994. Free proline accumulation in wheat seedlings influenced by *Fusarium culmorum* infection and the pathogen metabolite deoxynivalenol. *Acta Physiologiae Plantarum*, 16, 111-116
- Belščak-Cvitanović A, Durgo K, Hudek A, Bačun-Družina V, Komes D, 2018. Overview of polyphenols and their properties. V: Galanakis CM (ur). *Polyphenols: properties, recovery and applications*. Sawston, Združeno kraljestvo, Woodhead Publishing: 3-44
- Braga RM, Padilla G, Araújo WL, 2018. The biotechnological potential of *Epicoccum* spp.: diversity of secondary metabolites. *Critical Reviews in Microbiology*, doi: 10.1080/1040841X.2018.1514364: 20 str.
- Carpenter SR, Caraco NF, Correll DL, Howarth RW, Sharpley AN, Smith VH, 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*, 8, 3: 559-568
- Cassman KG, Dobermann A, Walters DT, 2002. Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. *Ambio Royal Swedish Academy of Sciences*: 132-140
- Chowdhury A, Pradhan S, Saha M, Sanyal N, 2008. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 1: 114-127
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD, 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13,4: 414-430
- Droby S, Wisniewski M, Macarisin D, Wilson C, 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52, 2: 137-145
- Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ, 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360, 6390: 739-742
- Gorinstein S, Vargas OJM, Jaramillo NO, Salas IA, Ayala ALM., Arancibia-Avila P, Toledo F, Katrich E, Trakhtenberg S, 2007. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research and Technology*, 225, 321-328
- Hasan HAH, 1999. Phytotoxicity of pathogenic fungi and their mycotoxins to cereal seedling viability. *Mycopathologia*, 148, 149-155
- Ismail AA, Papenbrock J, 2015. Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agriculture*, 5, 492-537
- Jensen BD, Knorr K, Nicolaisen M, 2016. In vitro competition between *Fusarium graminearum* and *Epicoccum nigrum* on media and wheat grains. *European Journal of Plant Pathology*, 146, 3, doi: 10.1007/s10658-016-0950-6: 14 str.
- Khan AR, Ullah I, Waqas M, Shahzad R, Hong S-J, Park G-S, Jung BK, Lee I-J, Shin J-H, 2015. Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 9:1461-1466
- Kim DS, Cook RJ, Weller DM, 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87, 5: 551-558
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ, 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10: 845
- Köhl J, Postma J, Nicot P, Ruocco M, Blum B, 2011. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control*, 57, 1: 1-12
- Kreft S, Janež D, Kreft I, 2013. The content of fagopyrin and polyphenols in common and tartary buckwheat sprouts. *Acta Pharmaceutica*, 63, 4: 553-560
- Oerke EC, 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144, 1: 31-43
- Ogórek R in Płaskowska E, 2011. *Epicoccum nigrum* for biocontrol agents in vitro of plant fungal pathogens. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 76, 4:691-697
- Podolska G, Gujska E, Klepacka J, Aleksandrowicz E, 2021. Bioactive compounds in different buckwheat species. *Plants*, 10, 961, doi: 10.3390/plants10050961: 13 str.
- Shalaby S in Horwitz BA, 2014. Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal-plant interactions. *Current Genetics*, 61, 3:347-357
- Tekiner N, Tozlu E, Kotan R, Dadasoglu, 2020. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* with bioagent bacteria and

- fungi under in vitro conditions. Fresenius Environmental Bulletin, 29, 1:640-649
26. Tozlu E, Tekiner N, Kotan R, Örtücü S, 2018. Investigation on the biological control of *Alternaria alternata*. Indian Journal of Agricultural Sciences, 88, 8:1241-1247
27. Wallis CM in Galarneau ER-A, 2020. Phenolic compound induction in plant-microbe and plant-insect interactions: a meta-analysis. Frontiers in Plant Science, 11:580753. doi: 10.3389/fpls.2020.580753: 13 str.
28. Watkinson SC, Boddy L, Money NP, 2015. The Fungi. 3rd Edition. Cambridge, Academic Press: 466str.
29. Weiberg A, Wang M, Lin FM, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang HD, Jin H, 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. Science, 342, 6154: 118–123

Medsebojne interakcije glivnih endofitov in njihov vpliv na kalitev semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*)

Primož Fabjan, Ana Kolenc, Ana Rupar, Rebeka Udvarc

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Semena preko vertikalnega prenosa podedujejo tudi del mikrobioma rastline. Tako so že med kalitvijo v interakciji z različnimi endofiti, ki semenu pomagajo vzkliti. V svetu so trenutno velik problem glivne okužbe semen in zrn, ki so pomemben vir hrane, a lahko zaradi kontaminacij postanejo bolj škodljive kot hranljive.
- Tekom poskusov smo raziskovali medsebojne interakcije šestih glivnih endofitov, vpliv le-teh na kalitev tatarske ajde in vpliv na sekundarni metabolizem kalic.
- Svoje hipoteze smo preverjali s testi interakcij med glivami (antagonistični testi), s kalitvenimi testi, med katerimi smo opazovali uspešnost kalitve pri izpostavljenosti semen tatarske ajde izbranim glivam po 2 in 10 dneh in dolžino kalic po 10 dneh. Po 10 dneh smo analizirali skupne fenole v preživelih kalicah in s tem ovrednotili vpliv okužb na sekundarni metabolizem.
- Ugotovili smo, da na kaljivost semen *Phoma herbarum* (PH) nima vpliva, *Didymella* sp. (DIDY) in *Alternaria alternata* (AA) imata na kalitev rahlo negativen vpliv, najbolj pa se je kaljivost zmanjšala pri izpostavljenosti *Fusarium fujikuroi* SC (FF) in *F. germinarium* (FG). Vse glive so negativno vplivale na dolžino kalic, pri FG je preživela samo ena kalica. Nekatere glive so vplivale tudi na vsebnost fenolov, pri DIDY se je vsebnost fenolov povečala, pri AA pa zmanjšala. Pri antagonističnih testih smo pokazali, da PH v zavira rast AA.

Ključne besede: glivne okužbe, antagonistični testi, skupni fenoli

Uvod

Semena in zrna predstavljajo najpomembnejši vir hrane na svetu. Ajda zaradi manjšega donosa ni ena izmed pomembnejših poljščin, a v zadnjem času povpraševanje zanjo narašča zaradi bogate vsebnosti beljakovin, vitaminov, prehranskih vlaknin, esencialnih mineralnih elementov in flavonoidov v semenih ter pozitivnega vpliva na zdravje ljudi (Kreft, 1995; Suvorova in Zhou, 2018). Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) je dvokaličnica, a jo zaradi načina pridelave, predelave in uporabe uvrščamo med psevdžita. V primerjavi z navadno ajdo je bolj trpežna in prenese ostrejšo rastno razmere, poleg tega vsebuje višje koncentracije bioaktivnih spojin in ima močnejše pozitivne učinke na zdravje (Zhou in sod., 2018; Zhou, 2016).

Vse večji problem pri pridelavi semen in zrn predstavljajo glivne okužbe, saj so mikotoksini, ki jih izločajo nekatere glive, škodljivi za zdravje ljudi in živali ter tako predstavljajo problem za varnost hrane. Glive, ki napadajo semena žit, lahko razdelimo na poljske in skladiščne glive (Christensen 1957). Semena pa vsebujejo tudi endofite, organizme, ki se nahajajo v notranjosti rastlinskih tkiv in ne povzročajo vidne škode v gostitelju. Glivni endofiti so pomembni za rast in razvoj rastlin, fiziološko stanje in odpornost proti stresu. Razvoj in klitje semen sta eni najbolj kritičnih stopenj v življenjskem krogu rastline in endofiti imajo pomembno vlogo za zdravje in produktivnost semen v tem obdobju (Nelson, 2017). Za odpornost rastlin proti filamentoznim glivam so pomembni tudi polifenoli, katerih koncentracija v semenih se poveča, ko pride do okužbe, s tem pa rastlina poskrbi za odstranjevanje reaktivnih kisikovih spojin (Bennett in Wallsgrave, 1994). Rodo *Phoma* je rod gliv, ki je prisoten tako v tleh, vodi in zraku. Endofitske vrste tega rodu se pojavljajo v različnih rastlinah in so odgovorne za proizvodnjo širokega spektra sekundarnih metabolitov, ki lahko imajo protibakterijsko, protiglivično, protivirusno, algicidno in citotoksično delovanje. Gliva *Phoma herbarum* bi zaradi svojega delovanja lahko bila uporabljena kot bioherbicid, giberelini, ki jih proizvaja, pa bi lahko bili uporabni za spodbujanje rasti rastlin (Rai in sod., 2020). Vrste iz rodu *Didymella* so glivni patogeni, ki povzročajo okužbe rastlin, slednje pa vodijo do zmanjšane kvalitete semen in vsakoletne izgube pridelka različnih rastlin po svetu (Sistani in sod., 2017). Gliva *Alternaria alternata* je patogena vrsta glive, ki kolonizira semena določenih rastlin v različnih stopnjah razvoja in med skladiščenjem. Gliva proizvaja sedem toksinov, ki kontaminirajo hrano in so lahko škodljivi tako za ljudi kot za živali (Chulze in sod., 1995). Bulajić in sodelavci so leta 2009 raziskovali vpliv okužbe semen korenja, peteršilja, pastinaka in zelene z glivo *Alternaria alternata* in zaznali zmanjšanje vznika semen pri vseh vrstah.

Fuzarioze so četrte najpogostejše bolezni žit v Evropi, ki jih povzročajo različne glive iz rodu *Fusarium* in odražajo različne bolezenske znake. Gliva *Fusarium graminearum* povzroča fuzarijsko pegavost pšeničnih in rženih klasov, ki se kaže kot tipično pobeljenje klasa delno ali v celoti. Mehanizem širjenja bolezni je preko okuženih semen, lahko pride do okužbe preko tal ali do okužbe klasa neposredno z žetvenih ostankov ali z listja. Okužba s fuzarijsko pegavostjo pšeničnih in rženih klasov povzroči zmanjšano maso in število zrn ter posledično manjši pridelek, hkrati glive iz rodu *Fusarium* izločajo mitotoksine, ki so zelo strupeni že v majhnih količinah (Gilbert in sod., 2010; Sreš, 2013). Yang in sodelavci so leta 2011 v svoji

raziskavi inokulirali semena ječmena z glivo *F. graminearum* in po treh dneh zaznali povečano akumulacijo albumina in vodikovega peroksida v semenih, povečano ekspresijo proteinov toplotnega šoka, antioksidativnih encimov in proteinov, vpletenih v primarni metabolizem in detoksifikacijo ter zmanjšano ekspresijo rastlinskih proteaznih inhibitorjev. Vse to nakazuje na povezavo med povečanim energetskim metabolizmom in oksidativnim stresom med kaljenjem semen ječmena kot odgovor na okužbo z glivo *F. graminearum*. Gliva *F. fujikuroi* je razširjen rastlinski patogen, ki povzroča bolezen bakanae pri rižu, okuži pa lahko tudi druge gospodarsko pomembne rastline, kot so koruza, sladkorni trs, pšenico in šparglje (Cen in sod., 2020). Okužba z glivo *F. fujikuroi* povzroča različne tipe simptomov, od propada klic do podaljševanja stebel, zaostajanja rasti v vegetativni fazi in okužbe semen. Leta 2019 so Sunani in sodelavci raziskovali patogenezo riževih zrn z glivo *F. fujikuroi*. Največjo kolonizacijo patogena so opazili v lupini, prisotnost glive pa so zaznali tudi v embriju in endospermu zrn. Ugotovili so, da lahko pride do okužbe rastline preko zrn, zemlje in preko zraka.

Gliva *Botrytis cinerea* je rastlinski patogen z nekrotrofičnim načinom življenja, ki povzroča škodo na več kot 200 vrstah pridelka po vsem svetu. Najbolj uničujoč je za zrela tkiva dvokaličnih gostiteljev, vendar običajno vstopi v takšna tkiva na zgodnejši stopnji razvoja pridelka in ostane v mirovanju dokler ni okolje ugodno in se fiziologija gostitelja spremeni. Zato nastane resna škoda na pridelku šele med skladiščenjem ali transportom navidezno zdravih pridelkov (Williamson in sod., 2007).

Področje glivnih okužb in vpliva le teh na semena predstavlja pomembno področje za raziskovanje, saj lahko z boljšim razumevanjem poskrbimo za večjo varnost hrane, ki je ključna za reševanje problema globalne oskrbe s hrano.

Naše hipoteze so bile:

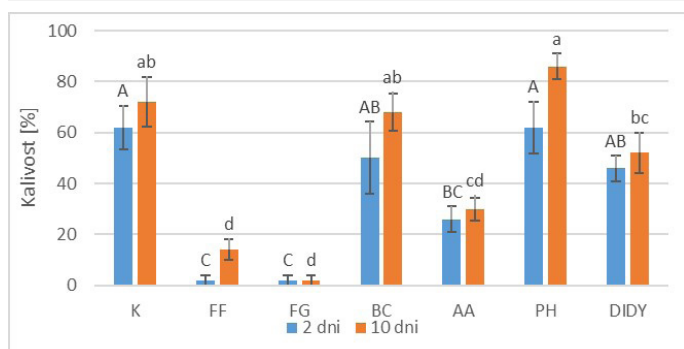
- Prisotnost gliv bo negativno vplivala na kalivost semen in dolžino kalic..
- PH in DIDY bosta zavirala rast patogenih gliv.
- Prisotnost gliv med kalitvijo bo vplivala na vsebnost skupnih fenolov v kalicah.

Materiali in metode

Test interakcije med glivami (antagonistični testi)

Čiste glivne kulture, gojene na 2% PDA gojišču, smo namnožili na sveže plošče tako, da smo iz starih plošč aseptično izrezali 1 cm x 1 cm velike koščke kultur in jih položili na sredino svežih plošč. Tako smo za potrebe naših poskusov namnožili glive *Phoma herbarum* (PH), *Didymella* sp. (DIDY), *Alternaria alternata* (AA), *Fusarium germinaerum* (FG), *Fusarium fujikuroi* SC (FF) in *Botrytis cinerea* (BC). Plošče smo inkubirali v rastni komori, pogoji v komori: dnevna temperatura 24 °C in nočna 20°C, v temi.

Iz svežih glivnih kultur smo čez en teden nastavili teste interakcij. Na plošče PDA smo inokulirali dve glivni kulturi, ju gojili in opazovali interakcije. Preverjali smo vpliv PH in DIDY na rast ostalih gliv. Tako smo za ti dve naslavili teste interakcij na 8 plošč v kombinaciji z vsako od preostalih štirih gliv (AA, BC, FF in FG). Na plošče smo položili 1 cm x 1 cm velike koščke dveh različnih glivnih kultur, tako da sta bila enako oddaljen od robov plošče in narazen približno 5 cm. V primeru kontrolnih



Slika 1: Kalivost semen tatarske ajde po 2 in 10 dneh pri kontroli (K; kalitev v sterilnih razmerah) in ob kokultivaciji z različnimi glivami (FF; *Fusarium fujikuroi* SC, FG; *Fusarium graminearum*, BC; *Botrytis cinerea*, AA; *Alternaria alternata*, PH; *Phoma herbarum*, DIDY; *Didymella* sp.). Na sliki je prikazana povprečna kalivost \pm standardna napaka (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami na posamezen dan določene z enosmerno ANOVO in Tukeyevim post-hoc testom ($p < 0,05$).

skupin smo na isto ploščo na enak način postavili 2 koščka iste glivne vrste, v enakem številu ponovitev.

Plošče s testi interakcij smo pregledali po 7 in po 14 dneh.

Vsakič smo izmerili polmere obeh gliv na ploščah in si zabeležili opažene okužbe na ploščah. Če smo opazili prevelik razrast okužb, smo take plošče izločili iz poskusa.

Vpliv inokulacije semen z glivami na kalitev semen tatarske ajde

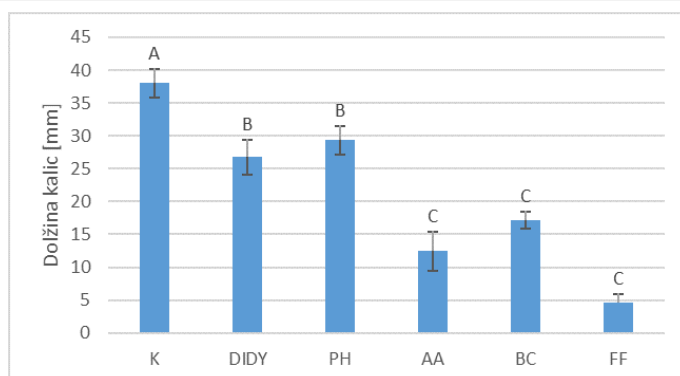
Za preverjanje vpliva vseh 6 vrst gliv na kalitev tatarske ajde smo prav tako na sveže plošče namnožili glivne kulture in jih pustili v rastni komori, dokler niso prerasle približno polovico plošče. Semena, ki so bila predhodno površinsko sterilizirana z namakanjem v 30% raztopini vodikovega peroksida za 20 minut, nato pa sprana z avtoklavirano bidestilirano vodo.

Na vsako od petih plošč z glivnimi kulturami smo položili po 10 semen, enakomerno po zunanem robu glive, tako smo umetno kontaminirali semena. Spremljali smo kaljivost in rast poganjka.

Po dveh in 10 dneh smo prešteli skaljena semena. Prav tako smo po 10 dneh izmerili dolžine vseh poganjkov (semen, ki so skalila).

Analiza skupnih fenolov v kalicah, kontaminiranih z glivami Po 10 dneh smo preživele kalice stehtali in jih strli v prah v terilnici s tekočim dušikom. Kalic pri glivah FG in FF ni bilo dovolj, da bi jih uporabili za analizo. 200 mg tako pripravljene prahu smo preko noči stresali v 10 mL 60 % etanola, da smo pridobili ekstrakt.

Celokupne fenole smo določili z metodo E. Kovačec in sod., 2016; prirejeno po I. Kreft in sod., 2013, z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta in merjenjem absorbance pri 750 nm. Za standard smo uporabili znane koncentracije katehola, s katerimi smo naredili umeritveno krivuljo.



Slika 2: Dolžina kalic tatarske ajde po 10. dneh pri kontroli (K; kalitev v sterilnih razmerah) in ob kokultivaciji z različnimi glivami (FF; *Fusarium fujikuroi* SC, FG; *Fusarium graminearum*, BC; *Botrytis cinerea*, AA; *Alternaria alternata*, PH; *Phoma herbarum*, DIDY; *Didymella* sp.) Na sliki je prikazana povprečna dolžina kalic \pm standardna napaka (K; n=36, DIDY; n=27, PH; n=42, AA; n=16, BC; n=34, FF; n=7). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami določene z enosmerno ANOVO in Tukeyevim post-hoc testom ($p < 0,05$).

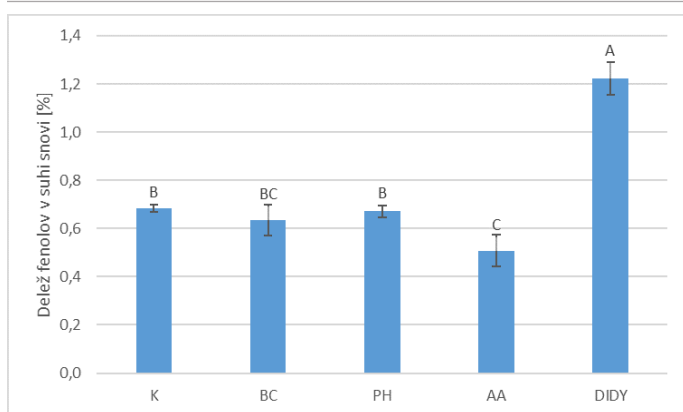
Rezultati

Kalivost semen

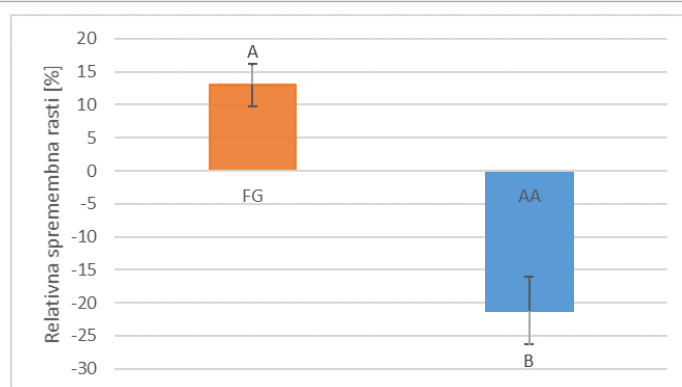
Pri kalitvenih testih smo ugotovili, da imajo nekatere glive statistično značilen vpliv na kalitev semen tatarske ajde (Slika

Tabela 1: Povprečne vrednosti polmerov kontrolnih gliv (PH, DIDY, AA, BC, FF, FG) in patogenih gliv v kokulturi (AA + DIDY, BC + DIDY, FF + DIDY, FG + DIDY, AA + PH, BC + PH, FF + PH, FG + PH) po 7 in 14 dneh. Z zvezdico so označene skupine, kjer smo z enosmerno ANOVO in Tukeyevim post-hoc testom ($p < 0,05$) določili statistično značilne razlike glede na kontrolo posamezne skupine.

Gliva oz. kombinacija gliv	Premer [mm]	
	7 dni	14 dni
PH	22,5 \pm 0,64	22,3 \pm 0,54
DIDY	20,6 \pm 1,32	23,0 \pm 1,04
AA	21,3 \pm 1,60	23,6 \pm 1,45
BC	22,3 \pm 0,60	23,9 \pm 0,97
FF	23,0 \pm 0,26	24,6 \pm 0,43
FG	21,9 \pm 0,55	23,9 \pm 0,59
AA + DIDY	17,4 \pm 1,63	23,0 \pm 1,36
BC + DIDY	22,5 \pm 1,18	22,5 \pm 1,18
FF + DIDY	22,4 \pm 0,84	25,3 \pm 1,19
FG + DIDY	22,1 \pm 1,34	24,6 \pm 0,56
AA + PH	16,8 \pm 1,08*	20,3 \pm 1,01
BC + PH	22,1 \pm 1,11	22,1 \pm 1,11
FF + PH	23,0 \pm 0,78	23,0 \pm 0,78
FG + PH	24,8 \pm 0,70*	24,9 \pm 0,67



Slika 3: Delež fenolov v suhi snovi 10 dni starih kalic pri kontroli (K; kalitev v sterilnih razmerah) in ob kokultivaciji z različnimi glivami (BC; *Botrytis cinerea*, PH; *Phoma herbarum*, AA; *Alternaria alternata*, DIDY; *Didymella* sp.). Na sliki je prikazan povprečni delež fenolov v suhi snovi \pm standardna napaka (n=3). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami določene z enosmerno ANOVO in Tukeyevim post-hoc testom ($p < 0,05$).



Slika 4: Vpliv glive *Phoma herbarum* na rast gliv *Fusarium graminearum* (FG) in *Alternaria alternata* (AA). Na sliki je prikazana povprečna relativna sprememba rasti po 7 dneh kokultivacije z glivo *Phoma herbarum* \pm standardna napaka (n=8), glede na kontrolno skupino posamezne vrste. Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami določene z enosmerno ANOVO in Tukeyevim post-hoc testom ($p < 0,05$).

1). Glivi PH in BC nista imela vpliva na kalitev semen. Ob kokultivaciji z vsemi ostalimi glivami se je kalivost zmanjšala, najbolj pri FF in FG. Gliva AA je rahlo znižala kalivost semen.

Dolžina kalic

Prisotnost vseh gliv med kalitvijo semen je statistično značilno vplivala na dolžino kalic (Slika 2). V vseh skupinah z glivami so bile kalice manjše kot pri kontroli, najmanjše so bile pri vrstah AA, BC in FF.

Prisotnost gliv med kalitvijo semen je statistično značilno vplivala na delež fenolov v suhi masi le pri okužbah z dvema glivnima vrstama (Slika 3). Pri AA smo opazili manjši delež fenolov kot pri kontroli, pri DIDY pa skoraj dvakrat večji. Podatki za FF in FG niso prikazani, saj zaradi nizkega števila kalic nismo uspeli pridobiti dovolj materiala za analizo.

Antagonistični testi

S pomočjo antagonističnih testov smo opazili statistično značilen vpliv PH na rast FG in AA po 7 dneh kokultivacije. PH ni zavirala rasti FG, kvečjemu je FG zavirala rast PH. PH je zavirala tudi rast AA (Slika 4). Pri nobenem drugem antagonističnem testu (PH po 14 dneh in DIDY po 7 in 14) nismo opazili statistično značilnih razlik (Preglednica 1).

Diskusija

Na rastlinskih semenih lahko najdemo tako endofitske kot patogene glive, ki s proizvodnjo mikotoksinov in drugih proteinov lahko povzročajo bolezni. Rastlinske endofitske glive so opredeljene kot koristni mikroorganizmi, ki živijo v zdravih tkivih svojih gostiteljskih rastlin in običajno ne povzročajo očitnih simptomov bolezni (Zhong s sod. 2016). Zhong in sodelavci, 2016 so iz zdravih stebel tatarske ajde uspešno izolirali 72 izolatov endofitnih gliv in jih na podlagi morfoloških značilnosti in ITS sekvenc identificirali, kot pripadnike rodov *Alternaria*, *Bionectria*, *Botryosphaeria*, *Fusarium*, *Guignardia*,

Nectria, *Neonectria*, *Phomopsis*, *Pseudocercospora* in *Verticillium* spp. Čeprav so bile v tem primeru glive iz rodu *Alternaria* obravnavane kot endofiti tatarske ajde, pa je gliva *Alternaria alternata* tako pri ajdi kot drugih rastlinskih vrstah identificirana tudi kot patogena gliva, ki se prenaša preko semen in producira tenuazonsko kislino, alternariol, altenuen in druge alertoksine (Wachowska s sod. 2021). To potrjuje dejstvo, da so lahko v nekaterih primerih semena potencialni vir začetnega inokuluma za glivne bolezni (Kovačec s sod. 2016). Naši kalitveni testi tatarske ajde kažejo na to, da so nekatere glive zmanjšale kaljivost, vse pa so zmanjšale dolžino kalic tatarske ajde. Prenos glive *A. alternata* iz semena na kalice in vpliv nanje je bil dokazan tudi pri rastlinski vrsti *Sida hermaphrodita*. Semena te rastline so bila dodatno obdelana s suspenzijo glive *Aureobasidium pullulans*, kar je imelo pozitiven vpliv na razvoj rastline in obrambo pred okužbo z glivo *A. alternata* (Wachowska s sod. 2021). Biološka kontrola semen okuženih z glivo *A. alternata* je torej mogoča. Glede na naše rezultate bi lahko kot potencialni biološki agens proti temu patogenu dodatno analizirali še glivo *Phoma herbarum*, ki je v primeru kokultivacije z glivo *A. alternata*, zavirala njeno rast, ni pa imela statistično značilnega učinka na kaljivost in razvoj tatarske ajde, kar ji daje potencial kot biokontrolnemu agensu.

Poleg glive *A. alternata* sta na kaljivost in razvoj ajde negativno vplivali tudi *Fusarium fujikuroi* in *F. graminearum*, kar je v sosledju z literaturo, ki potrjuje, da ob pojavu gliv iz rodu *Fusarium* na ajdinih semenih, te povzročijo gnilobo korenin in stebel na razvijajoči rastlini. Prav tako je znano, da *Botrytis cinerea* povzroča hude oblike bolezni ajde. Čeprav je njena virulenca odvisna od seva, lahko povzroči odmiranje kalic ajde ter njihovo klorozo in nekrozo ter posledično precejšnje izgube pridelka, (Kovačec s sod. 2016) kar smo na podlagi kaljivosti in dolžine poganjka dokazali tudi v našem poskusu. Zmanjšana kaljivost semen je verjetno povezana z intenzivnim izločanjem ekstracelularnih encimov kot so amilaze, celulaze in polifenol-oksidaze (Kovačec s sod. 2016). V tem primeru

glive *P. hermarum* ne bi bila primerna za zaščitno proti *Fusarium graminearum*, ker je *F. graminearum* v ko-kulturi s *P. hermarum* rasel bolje v primerjavi s kontrolo.

Polifenoli so eni od sekundarnih presnovkov ajde. Spremembe vsebnosti teh imajo pomembno vlogo pri okužbah rastlin s filamentoznimi glivami. Povečana vsebnost fenolnih spojin namreč omogoči odstranitev reaktivnih kisikovih vrst in/ali povečanje vgradnje in navzkrižnega povezovanja fenolnih spojin s celično steno. Spremembe celične stene delujejo kot fizične ovire in preprečujejo razgradnjo njenih komponent. Po drugi strani imajo flavonoidi antibakterijsko delovanje in tako ščitijo rastlino med kalitvijo semen (Kovačec s sod., 2016). V kalicah tatarske ajde okužene z glivo *Didymella* sp. smo opazili skoraj dvakrat večji delež fenolov kot pri kontroli, kalitev pa je bila značilno zmanjšana glede na kontrolo. V nasprotju s tem je bilo pri okužbi z glivo *A. alternata* prisotnih manj fenolov kot pri kontroli, zmanjšanje kaljivosti semen ajde pa je bilo primerljivo zmanjšanju kaljivosti pri okužbi z *Didymella* sp. Rezultati si nasprotujejo, zato težko sklepamo logične zaključke glede povezanosti vsebnosti polifenolov v kalicah in uspešno kaljivostjo oz. učinkom polifenolov na biološki stres. Vendar pa so se s povečanjem vsebnosti fenolov pri okužbi z *Didymella applanata*, sicer srečali tudi Mikulič-Petkovšek in sod. (2014), ki so preučevali spremembe v vsebnosti fenolnih komponent kot posledica okužbe pri malini. Vsebnost polifenolov je nekoliko lažje povezati z rezultati dolžin kalic, pri katerih je opazna statistično značilna razlika med kalicami semen okuženih z glivama *Didymella* sp. in *A. alternata*. Povezanost lahko opazimo tudi pri okužbi z glivo *P. hermarum*, kjer je bila tako koncentracija polifenolov kot dolžina kalic primerljiva s kontrolo. Sklepamo lahko, da je bilo v primeru okužbe semena z *Didymella* sp. prisotnih toliko več fenolnih spojin, ki so zmanjšale vpliv glive na rast kalic, vendar rezultati tako močno izstopajo, da bi bilo za potrditev razlage poskus ponoviti. Razlog za zmanjšanje koncentracije fenolov pri okužbi z *A. alternata* bi bila lahko sinteza glivnih polifenol oksidazo (Kovačec s sod., 2016).

Zaključki

Zatiranje glivičnih bolezní z uporabo različnih fungicidov ima nevarne učinke tako na zdravje ljudi in živali, kot tudi na samo okolje. Zaradi kemičnega tveganja za obvladovanje glivičnih bolezní je biološki nadzor rastlinskih patogenih gliv ključen. S pomočjo dobljenih rezultatov smo hipoteze deloma potrdili. Pristnost vseh gliv, razen PH in BC je imela negativen vpliv na kalitev semen. Pristnost vseh gliv med kalitvijo je negativno vplivala na dolžino kalic. Z antagonističnimi testi smo potrdili negativen vpliv PH na AA po 7 dneh, vse druge interakcije med glivami niso bile statistično značilne. Prisotnost gliv med kalitvijo je vplivala na vsebnost skupnih fenolov v kalicah, kar smo lahko do neke mere povezali z dolžinami kalic. Z ugotovitvami naše raziskave smo dokazali zaviralen vpliv *P. hermarum* na *A. alternata*, ki je patogen tatarske ajde in tako njegov potencialni pomen kot biološki agens. Poleg tega smo prikazali pomembnost fenolnih spojin v rastlini pri odpornosti na biološki stres.

Literatura

1. Bennett RN, Wallsgrove RM, 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127, 4:617–633

2. Bulajić A, Djekić I, Lakić N, Krstić B, 2009. The presence of alternaria spp. On the seed of Apiaceae plants and their influence on seed emergence. *Archives of Biological Sciences* 61, 4:871–881
3. Cen YK, Lin JG, Wang YL, Wang JY, Liu ZQ, Zheng YG, 2020. The Gibberellin Producer *Fusarium fujikuroi*: Methods and Technologies in the Current Toolkit. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:232
4. Christensen CM, 1957. Deterioration of stored grains by fungi. *The Botanical Review* 23:108e134.
5. Chulze SN, Torres AM, Dalcero AM, Etcheverry MG, Ramírez ML, Farnochi MC. 1995. Alternaria Mycotoxins in Sunflower Seeds: Incidence and Distribution of the Toxins in Oil and Meal. *Journal of food protection* 58, 10:1133–1135
6. Gilbert J, Woods SM, Turkington TK, Tekauz A, 2005. Effect of heat treatment to control *Fusarium graminearum* in wheat seed. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27, 3:448–452
7. 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* 120:666–678
8. Kreft I, 1995. Ajda. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 112 str.
9. Mikulič-Petkovšek M, Schmitzer V, Stampar F, Veberic R, Koron D, 2014. Changes in phenolic content induced by infection with *Didymella applanata* and *Leptosphaeria coniothyrium*, the causal agents of raspberry spur and cane blight. *Plant Pathology* 63: 185–192.
10. Nelson EB, 2017. The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil* 422:1:7–34
11. Rai M, Gade A, Zimowska B, Ingle AP, Ingle P, 2020. Harnessing the potential of novel bioactive compounds produced by endophytic *Phoma* spp. - Biomedical and agricultural applications. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 19, 6:31–45
12. Sreš A, 2013. Aktualna problematika v varstvu pridelave žit. Bayer, razvoj in registracije, 27
13. Sistani NR., Kaul HP., Desalegn G, Wienkoop S, 2017. Rhizobium impacts on seed productivity, quality, and protection of *Pisum sativum* upon disease stress caused by *Didymella pinodes*: Phenotypic, proteomic, and metabolomic traits. *Frontiers in Plant Science* 8: doi:10.3389/fpls.2017.01961
14. Sunani SK, Bashyal BM., Kharayat BS, Prakash G, Krishnan SG, Aggarwal R, 2020. Identification of rice seed infection routes of *Fusarium fujikuroi* inciting bakanae disease of rice. *Journal of Plant Pathology* 102, 1:113–121
15. Suvorova G, Zhou M, 2018. Distribution of cultivated buckwheat resources in the world. V: *Buckwheat germplasm in the world*. Zhou M, Kreft I, Suvorova G, Tang Y, Woo SH (ur.). London, Elsevier:21–35
16. Wachowska U, Kwiatkowska E, Pluskota W, 2021. *Alternaria alternata* as a seed-transmitted pathogen of *Sida hermaphrodita* (Malvaceae) and its suppression by *Aureobasidium pullulans*. *Agriculture* 11, 12:1264
17. Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL, 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8, 5:561–580
18. Yang F, Svensson B, Finnie C, 2011. Response of germinating barley seeds to *Fusarium graminearum*: The first molecular insight into Fusarium seedling blight. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 11:1362–1368
19. Zhong LY, Zou L, Tang XH, Li WF, Li X, Zhao G, Zhao JL, 2017. Community of endophytic fungi from the medicinal and edible plant *Fagopyrum tataricum* and their antimicrobial activity. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 16:387–396.
20. Zhou F, 2016. Chemical composition and health effects of tartary buckwheat. *Food Chemistry* 203:231–245
21. Zhou M, Tang Y, Deng X, Ruan C, Ding M, Shao J, Tang Y, Wu Y, 2018. Description of cultivated tartary buckwheat. V: *Buckwheat germplasm in the world*. Zhou M, Kreft I, Suvorova G, Tang Y, Woo SH (ur.). London, Elsevier:45–52

Biofortifikacija kalic soje s cinkom

Katarina Hrovat, Nika Paternost, Neža Škofljanc, Nika Tivadar

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

- Namen raziskave je bil ugotoviti vpliv namakanja semen soje (*Glycine max* (L.) Merr) v cinkovem kloridu ($ZnCl_2$) na kaljivost semen, suho in svežo maso kalic ter koncentracijo cinka (Zn) in nekaterih esencialnih elementov v kalicah.
- Semena soje smo 3 ure namakali v destilirani vodi ter različnih koncentracijah $ZnCl_2$ (0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM). Semena smo kalili v temi, kalice pa vzgojili v kalilnikih v rastni komori. Po sedmih dneh smo ločili poganjke od korenin ter poganjkom določili svežo in suho maso. Suh material smo uporabili za izdelavo tabletk, na katerih smo naredili analizo elementne sestave z metodo rentgensko fluorescenčne spektrometrije.
- Obravnava semen z različnimi koncentracijami $ZnCl_2$ ni bistveno vplivala na svežo in suho maso kalic, kaljivost semen pa se je v primerjavi s kontrolnimi semeni znižala pri semenih, obravnavanih z najvišjo uporabljeno koncentracijo $ZnCl_2$ (10 mM). V kalicah se je v odvisnosti od koncentracije $ZnCl_2$ statistično značilno povečala koncentracija Zn, med obravnavami pa so bile opazne tudi razlike v elementni sestavi.
- V naši raziskavi smo pokazali, da je namakanje semen soje v $ZnCl_2$ uspešna metoda za povišanje koncentracije Zn v kalicah. Upoštevajoč vse rezultate, bi bila najbolj optimalna metoda za biofortifikacijo kalic soje s Zn namakanje semen v 1 mM raztopini $ZnCl_2$ za tri ure pri sobni temperaturi.

Ključne besede: Pomanjkanje Zn, kalitveni test, mikrohranila, razvoj kalic, mineralna prehrana, rentgenska fluorescenca.

Uvod

Soja je danes ena izmed najbolj ekonomsko pomembnih rastlin, predvsem v Južni in Severni Ameriki ter Aziji. Zaradi svoje visoke vsebnosti beljakovin, nenasičenih maščobnih kislin ter mineralov se uporablja tako v kmetijstvu kot tudi v živilski industriji (Liu 1997; Longley s sod. 2020). Vsebnost posameznih elementov v vzgojenih rastlinah je odvisna od mnogih okoljskih dejavnikov, na katere pogosto nimamo neposrednega vpliva (Szostak s sod. 2020). Prehrana rastlinskega izvora ima tako zelo raznoliko vsebnost hranil, kar lahko pri monotonem načinu prehranjevanja vodi v pomanjkanje pomembnih hranil. Znano je, da se prebivalci držav v razvoju zaradi načina prehranjevanja, ki ga sestavljajo predvsem žita soočajo s pomanjkanjem cinka (Zn) (Gibson in Ferguson 1998). Ta ima pomembno vlogo pri delovanju mnogih encimov, ki sodelujejo v metabolnih poteh, zato pomanjkanje lahko vodi do zdravstvenih težav pri odraslih in razvojnih težav pri otrocih (Cousins in McMahon 2000). Ena izmed možnih in finančno dostopnih rešitev v agronomiji, s katero lahko dosežemo večjo vsebnost mikrohranil predvsem v delih rastlin, ki jih uživamo, je biofortifikacija (Praharaž in sod. 2021; White in Broadley 2009). Biofortifikacijo lahko izvedemo na več različnih načinov: z dodajanjem hranil v prst, s foliarnim gnojenjem rastlin ter z namakanjem semen v raztopini. Vsaka izmed tehnik pa ima svoje prednosti in pomanjkljivosti (Praharaž s sod. 2021). Harris s sod. (2008) so z namakanjem zrn pšenice in semen čičerike v raztopini cinkovega sulfata ($ZnSO_4$) uspeli povišati koncentracijo Zn v kalicah obeh vrst.

Namen raziskave je bil preveriti vpliv namakanja semen soje v različno koncentriranih raztopinah cinkovega klorida na koncentracijo Zn v poganjkah kalic ter preveriti vpliv na kaljivost semen. Predvidevamo, da bodo kalice iz obravnave z višjo koncentracijo raztopine cinkovega klorida vsebovale več Zn. Pri višji koncentraciji raztopine bo delež skaljenih semen večji, prav tako pa bosta večji sveža in suha masa kalic pri obravnavah z višjo koncentracijo raztopine cinkovega klorida.

Material in metode

Semena soje (*Glycine max*) smo v preliminarnem poskusu namakali 24 ur v destilirani vodi in naraščajočih koncentracijah cinkovega klorida – 0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM. Iz vsake obravnave smo po 100 semen razvrstili v pet petrijevok prekritih z omočenim filter papirjem z namenom, da bi preverili kaljivost semen. Preostala semena smo položili na omočen filter papir v kalilnikih in jih v komori pri stalnih pogojih (21° C, 60 % vlaga, 16/8 urna fotoperioda) kalili teden dni. Semena v petrijevkah smo pri enakih pogojih in v popolni temi, prav tako kalili 7 dni. Po tednu dni smo prešteli skaljena semena v petrijevkah in ocenili uspešnost vzgoje kalic. Ugotovili smo, da skoraj nobeno seme ni skalilo, večina kalic pa je zgnila. Predvidevamo, da smo semena predolgo namakali. Poskus smo ponovili pri čemer smo semena namakali le tri ure v destilirani vodi in enakih naraščajočih koncentracijah cinkovega klorida. Tokrat je večina semen skalila in kalice so bile v boljšem stanju. Po sedmih dneh kaljenja, smo prešteli število skaljenih semen v petrijevkah, kalicam v kalilnikih pa smo ločili poganjke od korenin in korenine zavrgli. Poganjkom smo določili svežo maso in jih v aluminijasti foliji sušili v sušilniku pri 60°C sedem dni. Posušene kalice smo stehali in strli v terilnici. Iz prahu rastlinskega materiala smo s pomočjo

hidravlične stiskalnice pripravili tabletko. Z uporabo rentgensko fluorescenčne spektrometrije (XRF) (Nečemer s sod. 2008) smo tabletkam izmerili koncentracije fosforja (P), žvepla (S), kalija (K), kalcija (Ca), mangana (Mn), železa (Fe), bakra (Cu) in Zn ter pridobljene rezultate statistično obdelali v programu R in SigmaPlot. Z analizo variance (ANOVA) smo določili značilen vpliv obravnavanj na merjene parametre, ki smo jih dodatno analizirali s Holm-Sidak post-hoc testom pri $p < 0,05$.

Rezultati

Kaljivost semen po namakanju semen v različnih koncentracijah cinkovega klorida

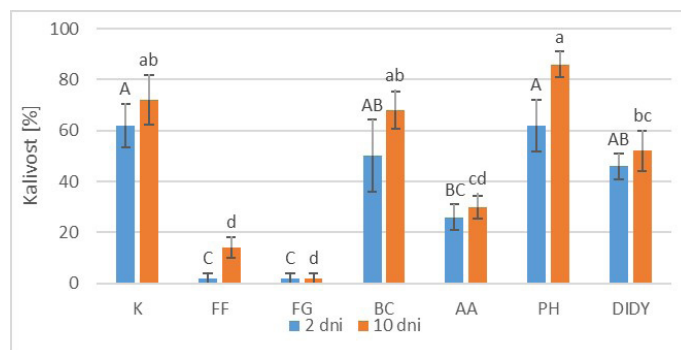
V preliminarnem poskusu, ko smo semena 24 ur namakali v destilirani vodi in naraščajočih koncentracijah cinkovega klorida (0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM), je večina semen zgnila, zato smo poskus ponovili tako, da smo semena namakali le 3 ure. Procent kaljivosti je bil v primerjavi s preliminarnim poskusom večji. Najvišjo kaljivost pa so imele kontrolne kalice ($70 \pm 18,7\%$) ter tiste, ki smo jih namakali v 1 mM raztopini ($69 \pm 10,8\%$), pri drugih obravnavah pa je bila kaljivost manjša. (Tabela 1).

Sveža in suha masa kalic

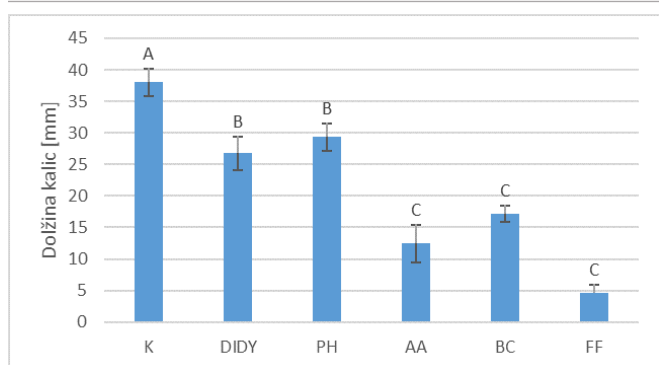
Statistično značilna razlika v sveži masi kalic je bila le med kontrolnimi kalicami ter kalicami katerih semena smo namakali

Tabela 1: Povprečna kaljivost semen soje izražena v procentih \pm standardna napaka (SD) pri $n = 5$ po tri urnem namakanju v različnih koncentracijah cinkovega klorida: (0 mM (Kontrola), 0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM).

Obravnava	Povprečna kaljivost (%) \pm SD
Kontrola	$70 \pm 18,7$
0,5 mM	60 ± 31
1 mM	$69 \pm 10,8$
5 mM	$58 \pm 29,1$
10 mM	$39 \pm 15,6$



Slika 1: Sveže in suhe mase kalic soje, katerih semena smo 3 ure pri sobni temperaturi namakali v naraščajočih koncentracijah cinkovega klorida (0 mM (Kontrola), 0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM). Prikazane so povprečne vrednosti \pm standardna napaka ($n = 4$). Različne črke označujejo statistično značilne razlike in so bile določene z enosmerno ANOVA, s Holm-Sidak post-hoc testom pri $p < 0,05$.



Slika 2: Koncentracija cinka (Zn) v kalicah soje, katera semena smo 3 ure pri sobni temperaturi namakali v različnih koncentracijah raztopine cinkovega klorida (0 mM (Kontrola), 0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM). Prikazana so povprečja ± standardna napaka (n = 4). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med obravnavami in so bile določene z enosmerno ANOVA, s Holm-Sidak post-hoc testom, pri $p < 0,05$.

v 0,5 mM raztopini cinkovega klorida, pri katerih se je sveža masa v primerjavi s kontrolnimi, zvišala za 0,07 g (Slika 1). Suha masa kalic se statistično značilno ni razlikovala med obravnavami.

Koncentracija Zn v kalicah

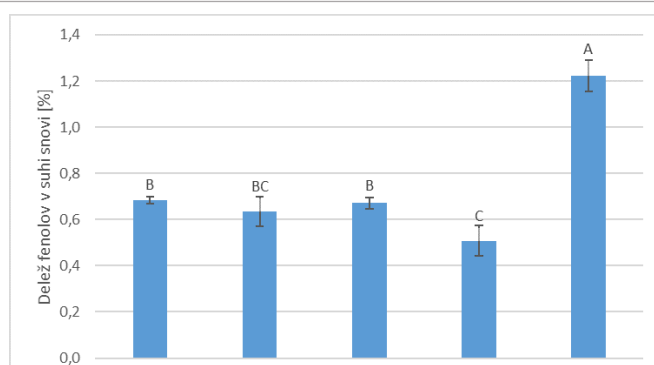
Koncentracija Zn v kalicah je naraščala s povečevanjem koncentracije cinkovega klorida v raztopini, v kateri smo namakali semena. Najnižjo koncentracijo smo izmerili pri kontrolnih rastlinah, ki se je statistično značilno razlikovala od kalic, katerih semena so bila namočena v 5 mM in 10 mM raztopino cinkovega klorida, med kontrolo in ostalima dvema obravnavama pa statistično značilne razlike v koncentracijami Zn ni bilo. Največjo spremembo koncentracije Zn smo opazili med kalicami pri obravnavah 5 mM in 10 mM cinkovega klorida, kjer se je koncentracija Zn pri obravnavi 10 mM v primerjavi s kalicami iz obravnave 5 mM povečala za skoraj dvakrat (Slika 2).

Koncentracija ostalih elementov v kalicah

Z analizo ANOVA smo ugotovili, da se koncentracije P, Mn in Cu statistično značilno ne razlikujejo med obravnavami, Cl pa je bil pod mejo detekcije, zato učinkov na koncentracije Cl nismo mogli opisati. Povprečna koncentracija P v kalicah je bila $2498 \pm 119 \text{ mg kg}^{-1}$, povprečna koncentracija Mn je bila $66 \pm 3,3 \text{ mg kg}^{-1}$, povprečna koncentracija Cu pa $20,3 \pm 2,4 \text{ mg kg}^{-1}$ (n = 20). Pri kalicah iz obravnave 1 mM cinkovega klorida, je bila opazna povišana koncentracija S, K, Ca ter Fe, kjer se le-te koncentracije niso vedno statistično značilno razlikovale od ostalih obravnav (Slika 3). Pri kalicah iz obravnave 5 mM in 10 mM cinkovega klorida je opazno znižanje koncentracije S in Ca (Slika 3a in 3c), čeprav statistično neznačilno.

Diskusija

Rezultati so pokazali, da je bila pri testu kaljivosti znotraj posamezne obravnave prisotna zelo velika variabilnost, zato bi bilo test kaljivosti potrebno ponoviti. Kljub temu pa lahko opazimo, da se je povprečna kaljivost semen iz obravnave



Slika 3: Koncentracije žvepla (S), kalija (K), kalcija (Ca) in železa (Fe) v kalicah soje, katerih semena smo 3 ure pri sobni temperaturi namakali v različnih koncentracijah raztopine cinkovega klorida (0 mM (Kontrola), 0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM). Prikazana so povprečja ± standardna napaka (n = 4). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med obravnavami in so bile določene z enosmerno ANOVA, s Holm-Sidak post-hoc testom, pri $p < 0,05$.

10 mM cinkovega klorida znižala v primerjavi s kontrolnimi semeni. Zn je esencialni element in rastlina ga nujno potrebuje za rast in razvoj, vendar pa je v presežku lahko strupen (Broadley s sod. 2007). Kot so ugotovili Rehman s sod. (2015), bi boljšo kaljivost semen lahko dosegli, če bi za namakanje uporabili raztopino ZnSO_4 , saj na rastline negativno vpliva šele v veliko višjih koncentracijah, kot tistih, ki smo jih uporabili v našem poskusu. Pokazano je, da je raztopina cinkovega klorida že v nižjih koncentracijah za rastline strupena, saj visoke koncentracije Zn omejujejo rast korenine, Cl- pa ima možen strupen učinek na fotosintezo in celično dihanje (Rehman s sod. 2015). S to trditvijo bi lahko razlagali to, da so kalice semen, ki smo jih v preliminarnem poskusu v raztopini cinkovega klorida namakali 24 ur, zgnile. Višjo kaljivost semen, ki so bila namočena v ZnSO_4 , so pokazali Zou s sod. (2014), kjer so imela semena, ki so bila za osem ur namočena v $100 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ZnSO}_4$, kaljivost nad 97 %. Bolj uspešno rast soje so pokazali tudi Muhammad s sod. (2017), kjer so pri rastlinah, katera semena so bila namočena v 10 mM ZnSO_4 opisali samo $13 \pm 5 \%$ nenormalno razvitih rastlin soje.

Med rezultati suhe mase kalic ni bilo opaženih statistično značilnih razlik, med tem ko so najvišjo svežo maso imele kalice iz obravnave 0,5 mM cinkovega klorida. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da različne koncentracije cinkovega klorida bistveno ne vplivajo na svežo in suho maso kalic.

Naša raziskava je pokazala, da biofortifikacija s cinkovega klorida vodi do akumulacije Zn v kalicah. Obogatitev kalic s Zn naj bi se zgodila ob prodoru okoliškega Zn čez semensko ovojnico med namakanjem semen (Zou s sod. 2014). V naši raziskavi se je koncentracija Zn v kalicah opazno zvišala, saj smo pri namakanju semen v 10 mM cinkovega klorida izmerili $384,5 \pm 37,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (pri n = 4), kar je šest-kratno povečana koncentracija Zn v primerjavi s kontrolo (Slika 2). Podobno povečanje koncentracije Zn v semenih, ki so bile namočena v 10 mM ZnSO_4 , opisujejo tudi Muhammad s sod. (2017). Pomembno je, da pri kalicah, ki jih poskušamo biofortificirati, ne vplivamo negativno na koncentracije preostalih esencialnih elementov. Zaželeno je celo, da se njihova koncentracija zviša v primerjavi s kontrolnimi kalicami (Zou s sod. 2014). Pokazano

je bilo povečanje koncentracije Fe, Mn in Cu v kalicah soje, kvinoje in pšenice, katerih semena so bila namočena v $ZnSO_4$ (Lintschinger s sod. 1997). V našem poskusu se koncentracija P, Mn in Cu med obravnavami ni statistično značilno razlikovala, opazili pa smo zvišanje koncentracij Ca, S in Fe pri obravnavi 1 mM cinkovega klorida v primerjavi s kontrolo, pri višjih koncentracijah cinkovega klorida pa so se koncentracije teh elementov spet znižale (Slika 3).

Na podlagi rezultatov kaljivosti, sveže in suhe mase ter koncentracije Zn in ostalih elementov predlagamo, da je najbolj optimalna raztopina za biofortifikacijo semen soje 1 mM cinkovega klorida, saj se kaljivost v primerjavi s kontrolnimi semeni ni opazno znižala, vsebnost Zn pa se je povečala za 1,5-krat v primerjavi s kontrolnimi kalicami. V kalicah iz obravnave 1 mM cinkovega klorida, so se povečale tudi koncentracije S, Ca in Fe v primerjavi s kontrolnimi kalicami. Čeprav so najvišjo svežo maso dosegle kalice, katerih semena so bila obravnavana z 0,5 mM cinkovega klorida, je bila pri teh kalicah koncentracija S in K nižja kot pri kalicah iz obravnave 1 mM cinkovega klorida. Kljub temu da so iz semen, obravnavanimi z najvišjo koncentracijo cinkovega klorida zrastle kalice, ki so vsebovale največ Zn, je bil pri teh procent kaljivosti nizek, opazne pa so bile tudi nižje vsebnosti drugih mineralov, kot so S, K in Ca v primerjavi s kalicami iz obravnave z 1 mM cinkovega klorida.

Zaključek

S pridobljenimi rezultati lahko potrdimo prvo hipotezo, saj biofortifikacija semen soje s cinkovega klorida poveča vsebnost Zn v kalicah, vendar so bile nekatere uporabljene koncentracije cinkovega klorida previsoke. To smo ocenili iz nižje kaljivosti semen, namočenih v 10 mM cinkovega klorida v primerjavi s kontrolnimi semeni, ter iz znižanja koncentracije izmerjenih ostalih esencialnih elementov v kalicah, kot so S, K in Ca pri obravnavi z 10 mM cinkovega klorida, v primerjavi z obravnavo z 1 mM cinkovega klorida. Za ovrednotenje hipoteze, s katero smo predvidevali, da bo pri višji koncentraciji raztopine delež skaljenih semen večji, bi morali test kaljivosti ponoviti, zaradi prevelike variabilnosti med obravnavami. Na suho in svežo maso kalic namakanje semen v cinkovega klorida bistveno ni vplivalo, zato tretjo hipotezo lahko ovržemo, saj med obravnavami ni bilo bistvenih sprememb v sveži in suhi masi. Na podlagi dobljenih rezultatov predlagamo, da se za biofortifikacijo semen soje uporabi 1 mM raztopino cinkovega klorida, v kateri pred kalitvijo semena soje namakamo 3 ure pri sobni temperaturi in tako lahko povečamo koncentracijo Zn v užitnih kalicah, ekonomsko zanimivih kalčkih.

Literatura

1. Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A, 2007. Zinc in plants. *New phytologist* 173(4): 677-702.
2. Cousins RJ, McMahon RJ, 2000. Integrative aspects of zinc transporters. *The journal of nutrition* 130(5):2384S-1388S.
3. Gibson RS, Ferguson EL, 1998. Nutrition intervention strategies to combat zinc deficiency in developing countries. *Nutrition research reviews* 11(1):115-31.
4. Harris D, Rashid A, Miraj G, Arif M, Yunas M, 2008. ' On-farm ' seed priming with zinc in chickpea and wheat in Pakistan. *Plant soil* 306:3-10.
5. Muhammad I, Volker R, Günter N, 2017. Accumulation and distribution of Zn and Mn in soybean seeds after nutrient seed priming and its contribution to plant growth under Zn- and Mn-deficient conditions. *Journal of plant nutrition* 40(5):695-708.
6. Lintschinger J, Fuchs N, Moser H, Jager R, Hlebina T, Markolin G, Gossler W, 1997. Uptake of various trace elements during germination of wheat, buckwheat and quinoa. *Plant foods for human nutrition* 50(3):223-237.
7. Liu K, 1997. Chemistry and nutritional value of soybean components. *Soybeans* 25-113.
8. Longley R, Noel ZA, Benucci GM, Chilvers MI, Trail F, Bonito G, 2020. Crop Management impacts the soybean (*Glycine max*) microbiome. *Frontiers in microbiology* 11:1116.
9. Nečemer M, Kump P, Ščančar J, Jačimović R, Simčič J, Pelicon P, Budnar M, Jeran Z, Pongrac P, Regvar M, Vogel-Mikuš K, 2008. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. *Spectrochimica acta - Part B* 63(11): 1240-1247.
10. Praharaj S, Skalicky M, Maitra S, Bhadra P, Shankar T, Brestic M, Hejnak V, Vachova P, Hossain A, 2021. Zinc biofortification in food crops could alleviate the zinc malnutrition in human health. *Molecules* 26(12):3509.
11. Rehman A, Farooq M, Ahmad R, Basra SM, 2015. Seed priming with zinc improves the germination and early seedling growth of wheat. *Seed science and technology* 43(2):262-268.
12. Szostak B, Głowacka A, Klebaniuk R, Kiełtyka-Dadasiewicz A, 2020. Mineral composition of traditional non-GMO soybean cultivars in relation to nitrogen fertilization. *The scientific world journal* 2020:15.
13. White P.J., Broadley M.R, 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - Iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182, 1: 49-84.
14. Zou T, Xu N, Hu G, Xu H, 2014. Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. *Journal of the science of food and agriculture*, 94(14):3053-60.

Biofortifikacija kalic oljne ogrščice s cinkom

Ajda Dešman, Tina Telban Stoilković, Tjaša Šentjurc, Bronja Vencelj Merc

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

- Namen raziskave je bil testirati vpliv namakanja semen oljne ogrščice (*Brassica napus* L.) v različne koncentracije cinkovega klorida ($ZnCl_2$) na kaljivost, rast in privzem mineralov (predvsem cinka, Zn) pri kalicah.
- Semena oljne ogrščice smo 24 ur namakali v različnih koncentracijah $ZnCl_2$, testirali kaljivost in jih 7 dni gojili v kalilnikih. Kalicam smo določili svežo in suho maso, nato pa še koncentracije elementov z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF).
- Namakanje semen v $ZnCl_2$ ni imelo značilnega vpliva na kalitev semen, kot tudi ne na svežo in suho maso kalic. Po pričakovanjih je namakanje semen z naraščajočimi koncentracijami $ZnCl_2$ sorazmerno vplivalo na povečanje koncentracije Zn v kalicah, ne pa tudi drugih elementov.
- Naša raziskava je pokazala, da je namakanje semen oljne ogrščice z naraščajočimi koncentracijami $ZnCl_2$ uspešna metoda za povečanje koncentracije Zn v kalicah oljne ogrščice.

Ključne besede: $ZnCl_2$, test kaljivosti, XRF, rastna komora, mikrohranila

Uvod

Pomanjkanje mikrohranil (t.i. "skrta lakota") je predvsem v državah v razvoju široko razširjen zdravstveni problem, ki naj bi prizadel okoli 2 milijardi ljudi (Bailey s sod. 2015). Med bolj kritičnimi je pomanjkanje cinka – več kot 17% svetovnega prebivalstva ga v prehrani ne zaužije dovolj (Wessells in Brown 2012), predvsem zaradi nizke koncentracije cinka v prsti (Praharaj s sod. 2021) ter zaradi pretežnega uživanja rastlinske hrane z nizko koncentracijo le-tega (Sharma s sod. 2013). Cink je ključen za delovanje imunskega sistema ter za normalen razvoj ploda. Njegovo pomanjkanje pa je povezano z motnjami rasti ter s povečano smrtnostjo zaradi respiratornih infekcij, driske in malarije (Bailey s sod. 2015). Cink je esencialni element tudi za rastline, zato lahko njegova nizka koncentracija v prsti močno zmanjša donos pridelka (Sharma s sod. 2013). Biofortifikacija – povečanje vsebnosti mikrohranil v rastlinah in rastlinskih živilih – se je izkazala kot obetavna strategija v boju proti pomanjkanju mikrohranil, predvsem vitamina A, železa in cinka (Hotz 2012). Z biofortifikacijo lokalno uveljavljenih osnovnih živil (npr. riža, fižola) je prehrano mogoče dolgoročno ter z relativno majhno denarno in infrastrukturno investicijo izboljšati, brez uvajanja novih prehranskih smernic (Bouis s sod. 2011).

Koncentracijo cinka v rastlini je mogoče povečati preko genetskih modifikacij (genska biofortifikacija) ali preko dognojevanja rastline z cinkom (agronomska biofortifikacija). Genetska biofortifikacija priskrbi rastline z želenimi lastnostmi (kot je npr. večja biodostopnost cinka), katerih semena se lahko na dolgi rok uporabljajo brez dodatnih stroškov - vendar je začetni vložek višji, razvoj pa dolgotrajnejši. Zgolj genetski pristop tudi ni zadosten za zagotovitev potrebne vsebnosti cinka v rastlinah, ki so bile pridelane na prsti, osiromašeni s cinkom (Praharaj s sod. 2021), zato se v večji meri poslužujemo agronomske biofortifikacije.

Agronomska biofortifikacija lahko poleg uporabe s cinkom obogatenih gnojil vključuje tudi namakanje semen v raztopino cinka (ang: seed priming). Obravnava semen navadne pšenice (*Triticum aestivum* L.) z raztopinami cinkovega sulfata ($ZnSO_4$) in cinkovega klorida je povečala vsebnost cinka v rastlinah

kar do 14% (Rehman in Farooq 2016). Tako so dokazali da biofortifikacija vpliva na mineralno sestavo kalic?

Namen naše raziskave je bil preučiti vpliv namakanja semen oljne ogrščice v raztopino cinkovega klorida na kaljivost, rast ter mineralno sestavo kalic. Predpostavljali smo, da bo obdelava semen oljne ogrščice s previsoko koncentracijo raztopine cinkov klorid negativno vplivala na rast rastline, da bo biofortifikacija povečala koncentracijo cinka v oljni ogrščici sorazmerno z višjo koncentracijo cinkovega klorida, vendar ne bo vplivala na koncentracijo drugih elementov v rastlini. Naš cilj je bil oceniti ali je namakanje semen učinkovita metoda za povečanje koncentracije cinka v kalicah oljne ogrščice.

Material in metode

Za izvedbo poskusa smo uporabili semena oljne ogrščice (*Brassica napus* L.), ki smo jih namakali v različnih koncentracijah cinkovega klorida (0,5mM, 1mM, 5mM in 10mM). Pri posamezni koncentraciji smo semena 24 ur namakali pri sobni temperaturi, kot kontrola pa je služilo namakanje v destilirani vodi.

Za izvedbo testa kaljivosti smo po 20 semen iz posamezne obravnave prenesli v petrijevke z navlaženim filter papirjem. Za vsako obravnavo smo izvedli 5 ponovitev. Petrijevke s semeni smo 7 dni inkubirali v rastni komori pri stalnih pogojih s temperaturo 22 °C, 60 % vlago in 16-urno fotoperiodo. Po inkubaciji smo prešteli število skaljenih semen.

Za izvedbo analize koncentracije elementov smo po 400 semen iz posamezne obravnave enakomerno porazdelili v pet banjic, ki smo jih prenesli v kalilnik (EasyGreen, Biovie, Francija). Kalilnike smo 1 teden inkubirali v rastni komori, pod enakimi pogoji kot pri testu kaljivosti. Po inkubaciji smo žive kalice (Slika 1) ločili od korenin in pripravili po štiri vzorce s približno enakim številom kalic za vsako obravnavo (50-100). Posamezne vzorce smo stehali in zabeležili povprečno svežo maso kalice, nato pa jih sušili v sušilniku 7 dni pri 60 °C. Po sušenju smo posamezne pakete kalic ponovno stehali, da smo pridobili povprečno vrednost suhe mase kalice. Suhe kalice smo nato strli v terilnici in s pomočjo hidravlične stiskalnice, s silo 4 ton, izdelali po eno tabletko na vzorec. Tabletke smo stehali in jim

z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF) izmerili koncentracije fosforja, žvepla, klora, kalija, kalcija, mangana, železa in cinka. Dobljene rezultate koncentracij smo nato obdelali s pomočjo enosmerne ANOVE in izvedli Holm-Sidakov post hoc test pri $p < 0,05$, ki nam je pokazal katere obravnave semen se statistično razlikujejo od ostalih.



Slika 1: Sedem dni stare kalice oljne ogrščice (*Brassica napus* L.), katerih semena smo 24 ur namakali v raztopino različnih koncentracij cinkovega klorida (od leve proti desni si sledijo kontrola in 0,5mM, 1mM, 5mM ter 10mM).

Rezultati

Kaljivost semen oljne ogrščice v odvisnosti od koncentracije $ZnCl_2$, uporabljene za njihovo namakanje

Namakanje semen v naraščajočih koncentracijah $ZnCl_2$ ni bistveno vplivalo na kaljivost semen. Pri vseh koncentracijah je bila kaljivost vsaj 90%, (Slika 2).

Sveža in suha masa kalic

Na svežo in suho maso kalic namakanje semen v raztopini $ZnCl_2$ ni značilno vplivalo. Sveža masa kalic se je gibala med 15 – 20 g, povprečna sveža masa kalic je znašala 17 g. Suhe mase kalic pri vseh koncentracijah cinkovega klorida so se gibale med vrednostmi 2,5 – 3,6 g. Povprečna suha masa kalic je znašala 2,7 g.

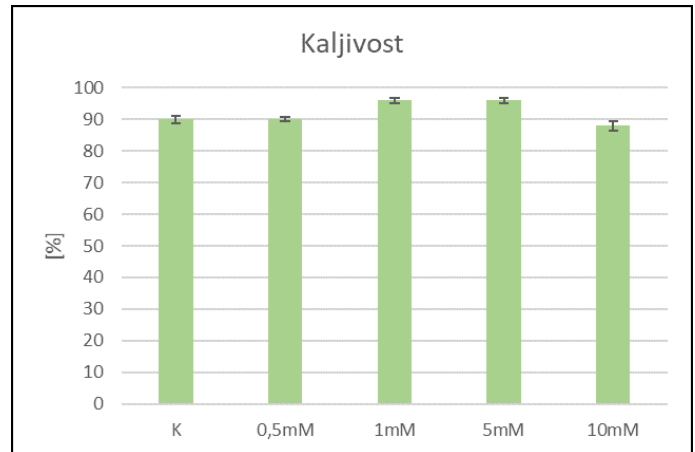
Mineralna sestava kalic

Namakanje semen v različnih koncentracijah $ZnCl_2$ je povečalo koncentracijo cinka v kalicah (Slika 3a). Na koncentracijo žvepla biofortifikacija ni vplivala (Slika 3b). Koncentracija klora se ni bistveno zvišala, kljub temu, da smo semena namakali v raztopino, ki je vsebovala različne koncentracije klora (Slika 3c). Znižanje koncentracije v odvisnosti od obravnavanj smo opazili pri kalciju (Slika 3e), medtem ko na koncentracijo preostalih elementov biofortifikacija ni bistveno vplivala (Slika 3). Najmanjša izmerjena koncentracija med vsemi elementi je bila pri manganu, vendar brez značilnih razlik med obravnavami.

Diskusija

Rezultati so pokazali, da raztopina cinkovega klorida, v katero namakamo semena oljne ogrščice, ne vpliva značilno na kaljivost.. Podobno so dokazali v študiji, kjer so namakali semena v 5 mM do 100 mM raztopini $ZnSO_4$. Koncentracije Zn, manjše od 50 mM so močno povečale kaljivost, višje od 50 mM pa so negativno vplivale na kalitev semen (Ajouri s sod. 2004). Obravnava semen oljne ogrščice s cinkovim kloridom ni imela vpliva na svežo in suho maso kalic. Dokazano je bilo, da cink v koncentraciji, višji od $20 \mu g mL^{-1}$ zavira rast, medtem ko naj bi jo nižje koncentracije spodbujale, kot so pokazali za sojine kalčke (Zou s sod. 2014). Biofortifikacija sojinih kalčkov s cinkom v koncentraciji 10 in $20 \mu g Zn mL^{-1}$ je povečala suho maso, kar je v nasprotju z našimi rezultati, kjer je suha masa ostala bolj ali manj nespremenjena. V omenjeni študiji so semena namakali 8 ur pri temperaturi $25^\circ C$ v raztopini $ZnSO_4$, ki je vsebovala Zn v koncentracijah 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 in $100 \mu g mL^{-1}$. Semena so zatem pustili kaliti 5 dni v temi pri $25^\circ C$.

Sorazmerno s povečano koncentracijo cinkovega klorida se je povečala koncentracija cinka v kalicah oljne ogrščice. Biofortifikacija s cinkom je učinkovita strategija pri povečevanju vsebnosti cinka tako v oljni ogrščici kot ostalih poljščinah (White in Broadley, 2011). V naši raziskavi se je koncentracija cinka v primerjavi s kontrolo povečala za skoraj 10x. Glede na to, da smo dodajali kloridne ione v obliki cinkov klorid smo pričakovali povišano koncentracijo klora. Vendar pa so naši rezultati pokazali statistično značilno povečanje le pri 0,5 mM, medtem ko je pri 1 mM koncentraciji cinkovega klorida,



Slika 2: Kaljivost semen oljne ogrščice (*Brassica napus* L.) v odvisnosti od različnih koncentracij cinkov klorid, v katerih smo namakali semena 24 ur pri sobni temperaturi. Pri posamezni obdelavi so prikazane povprečne vrednosti 20 semen (N=4) s standardno napako povprečja.

koncentracija klora celo upadla. V literaturi ni veliko podatkov, ki bi pojasnili spremembo koncentracije klora v kalicah, saj so v podobnih poskusih za namakanje večinoma uporabljali $ZnSO_4$ ne pa cinkov klorid. Koncentracija kalcija pri obravnavah 1 mM, 5 mM in 10 mM se je v primerjavi s kontrolo zmanjšala. Možna razlaga za to bi bila, da ima cink antagonistični učinek na kalcij. Biofortifikacija s cinkovim kloridom ni imela bistvenega vpliva na koncentracijo žvepla, kalija, mangana, fosforja in železa. Podobno so ugotovili tudi Zou s sodelavci 2014, ki so sicer uporabili sojine kalčke in koncentracije od 0 do $100 \mu g Zn mL^{-1}$.

Zaključki

Namakanje semen oljne ogrščice v raztopini cinkovega klorida je povečalo koncentracijo cinka v kalicah. Koncentracija cinka je bila najvišja v kalicah iz obravnave 5 mM in 10 mM cinkov klorid. Koncentracija klora v obravnavanih semenih se medtem ni statistično značilno zvišala. Biofortifikacija s cinkovim kloridom prav tako ni vplivala na vsebnost drugih merjenih elementov (fosforja, žvepla, železa, kalija in mangana) v kalicah. Višje koncentracije cinkovega klorida uporabljene za namakanje semen niso znatno vplivale na rast ali kaljivost kalic. Naš poskus biofortifikacije kalic s cinkom z uporabo namakanja semen v cinkovem kloridu uspešno prikaže učinkovito povečanje koncentracije cinka v kalicah oljne ogrščice, kar bi lahko uporabili za nadaljnje študije biofortifikacije z drugimi elementi in s tem omogočili še boljši vpogled v načine zmanjševanja skrite lakote.

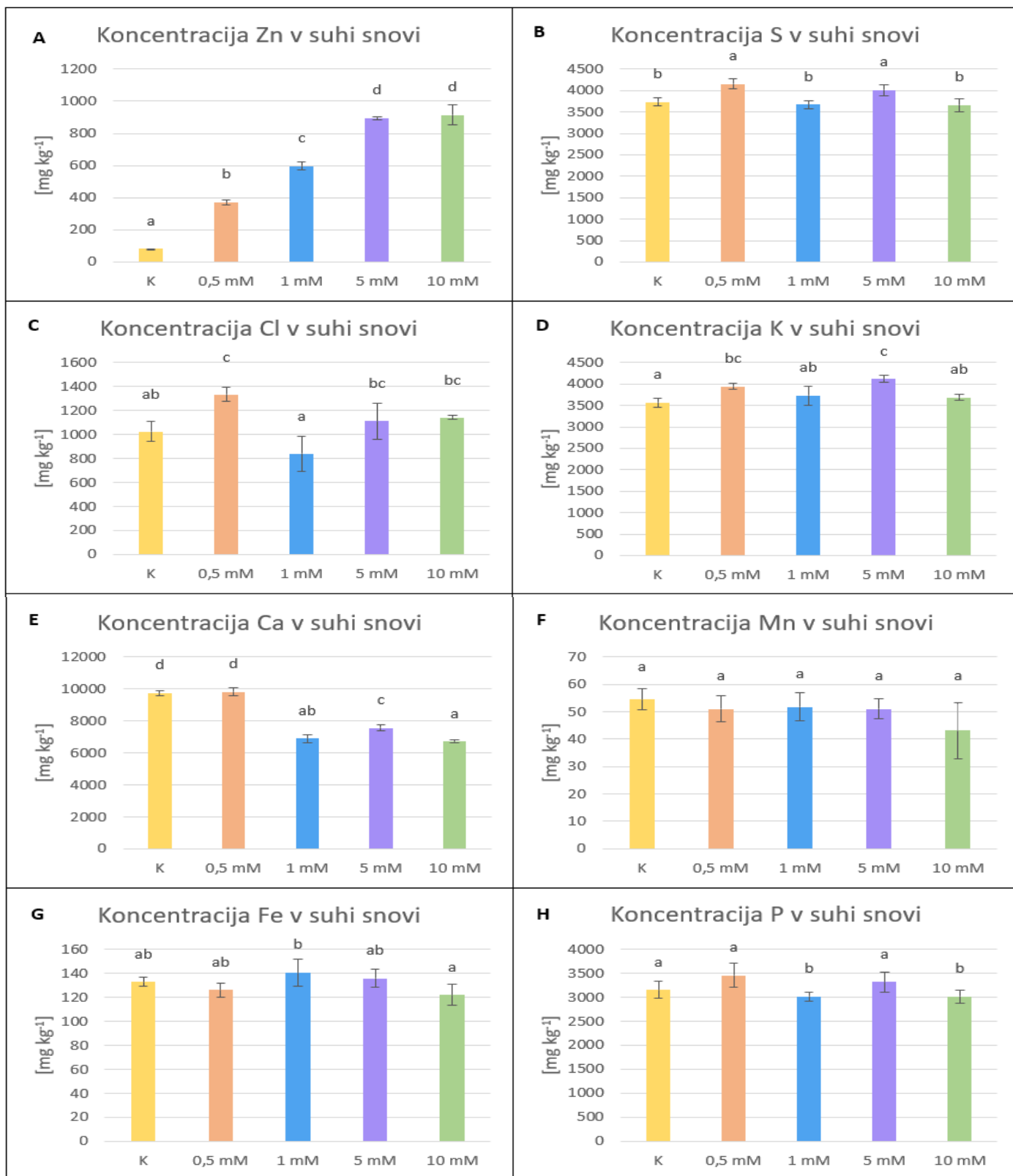
Literatura

- Ajouri A, Asgedom H, Becker M. 2004. Seed priming enhances germination and seedling growth of barley under conditions of Z and P deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167(5):630-636. <https://doi.org/10.1002/jpln.200420425>
- Bailey R L, West K P, Black R E 2015. The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66: 22–33. <https://doi.org/10.1159/000371618>
- Bouis H E, Hotz C, McClafferty B, Meenakshi J V, Pfeiffer W H 2011. Biofortification: A new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food and Nutrition Bulletin*, 32, 1: 31–40.
- Hotz C 2013. Biofortification. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 1, 4: 175–181. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00025-8>

5. Praharij S, Skalicky M, Maitra S, Bhadra P, Shankar T, Brestic M, Hejnak V, Vachova, P, Hossain A 2021. Zinc biofortification in food crops could alleviate the zinc malnutrition in human health. In *Molecules*, 26, 12. <https://doi.org/10.3390/molecules26123509>
6. Rietra R P, Heinen M, Dimkpa C O, Bindraban P S 2017. Effects

of nutrient antagonism and synergism on yield and fertilizer use efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 48,16: 1895– 1920.

7. Sharma A, Patni B, Shankhdhar D, Shankhdhar S C 2013. Zinc - an indispensable micronutrient. In *Physiology and Molecular Biology*



Slika 3: Koncentracija cinka (Zn), žvepla (S), klora (Cl), kalika (K), kalcija (Ca), mangana (Mn), fosforja (P) ter železa (Fe) v kalihach oljne ogrščice, katerih semena smo namakali 2 4ur pri sobni temperaturi v različnih koncentracijah cinkovega klorida. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti (N=4) in standardna napaka povprečja. Različne črke označujejo značilne razlike med obravnavanji (Holm- Sidak post-hoc test pri $p < 0,05$).

- of Plants, 19, 1: 11–20. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0139-1>
8. Wessells K R, Brown K H 2012. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: Results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. PLoS ONE, 7,11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050568>
9. White P J, Broadley M R 2011. Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. *Frontiers in Plant Science*, 2, 80.
10. Zou T, Xu N, Hu G, Pang J, Xu H 2014. Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94,14: 3053–3060. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24638829/>

Biofortifikacija kalic prosa s cinkom

Eva Cerkvėnik, Tara Fabčič, Katarina Šilc, Alenka Vesel

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

- Cink (Zn) je eden izmed esencialnih mikroelementov, ki v človeškem ontogenetskem razvoju pripomore k pravilnemu poteku številnih življenjsko potrebnih funkcij. S pomanjkanjem Zn v prehrani se soočajo predvsem otroci držav v razvoju. Z biofortifikacijo bi povečali koncentracijo biodostopnega Zn v živilih rastlinskega izvora ter s tem postopoma odpravljali pomanjkanje Zn pri živalih. Z eksperimentom smo torej želeli ugotoviti, ali namakanje zrn prosa v $ZnCl_2$ pomembno vpliva na povečanje koncentracije Zn v biomasi rastlin. Zanimalo nas je tudi, ali koncentracija $ZnCl_2$, v kateri namakamo zrna, vpliva na rast rastline in posledično na njeno biomaso.
- Zrna smo namakali v petih različnih koncentracijah $ZnCl_2$ in jih nato razdelili v petrijevke za kalitveni test ter v podolgovate posode, v katerih smo vzgojili kalice do ustrezne velikosti. Zrasle kalice smo odstranili od zrn, jih stehali ter dali v sušilnik. Posušene kalice smo strli v tekočem dušiku ter iz njih naredili tabletko. Koncentracijo posameznih elementov v tabletki smo izmerili s rentgensko fluorescenčno spektrometrijo.
- Analiza je pokazala, da različne koncentracije $ZnCl_2$, v katerih smo namakali zrna, niso pomembno vplivale na rast in biomaso kalic. Največ Zn smo zaznali v zrnih, namočenih v 10mM $ZnCl_2$. Koncentracija klora (Cl) je korelirala z naraščajočo koncentracijo Zn v kalicah. Zaznali smo tudi povečanje kalija (K). V kalicah pa je namakanje zrn v $ZnCl_2$ negativno vplivalo na koncentracijo železa (Fe), žvepla (S), kalcija (Ca) in fosforja (P), saj so se njihove koncentracije v primerjavi s kalicami, katerih zrna smo namakali v vodni raztopini, zmanjšale v odvisnosti od uporabljene koncentracije $ZnCl_2$.
- Z namakanjem zrn v $ZnCl_2$ smo uspešno biofortificirali kalice prosa, saj smo v njih uspeli povečati koncentracijo Zn. V prihodnje bi lahko testirali večje koncentracije $ZnCl_2$ za namakanje zrn z namenom še bolj povečati koncentracijo Zn v kalicah in biomaso kalic.

Ključne besede: *Panicum miliaceum*, prehranska vrednost, $ZnCl_2$, namakanje zrn

Uvod

Cink (Zn) je pomemben mikroelement za pravilno rast in razvoj rastlin, kot tudi za njihov imunski sistem in obrambo pred različnimi patogeni. V današnjem času ne slišimo veliko o pomembnosti Zn v prehrani, a je ta, pogosto pozabljen element, še kako esencijalen za človekov razvoj (Cabot s sod. 2019). V telesu igra pomembno vlogo kot kofaktor v več kot 300 encimih in kot strukturni gradnik proteinov, predvsem številnih transkripcijskih faktorjev (Palmgren s sod. 2008; Cakmak in Kutman 2018). Pomanjkanje Zn še vedno predstavlja svetovni zdravstveni problem, predvsem v razvijajočih se državah, kjer žita predstavljajo glavni vir prehrane. V zadnjih 100 letih je bilo žlahtnjenje žit usmerjeno v povečevanje pridelka na račun vsebnosti škroba, posledično pa se je koncentracija mineralov, vključno s Zn, močno zmanjšala (Cakmak in Kutman 2018). Ocenjujejo, da se s pomanjkanjem Zn sooča približno tretjina svetovnega prebivalstva, predvsem otroci mlajši od 5 let, ki za pravilno rast in razvoj potrebujejo več Zn (Wessells in Brown 2012). Glavni simptomi pomanjkanja Zn so zmanjšana rast, nepravilen razvoj možganov, večja dovzetnost za razvoj nalezljivih bolezni, slabša fizična zmogljivost in pojav zapletov ob rojstvu (Cakmak in Kutman 2018).

Cilj biofortifikacije je razviti rastline, ki imajo povečano koncentracijo biodostopnih mineralov oziroma določenih mikronutrientov v užitnih delih, primernih za prehrano (Palmgren s sod. 2008). To je mogoče doseči npr. s predhodnim tretiranjem zrn ali z dodajanjem nutrientov v obliki foliarnega gnojenja. Prednost slednjega je v tem, da Zn v škropivu ne reagira s komponentami tal in je rastlini zato bolj dostopen (Akhtar s sod. 2019). Pri tem je potrebno predvideti, kakšne so morebitne bariere za privzem dodanih hranil v užitne dele (t.i. pregrada med koreninami in poganjki, ki nadzira transport v nadzemne dele ter proces nalaganja hranil v žitno zrno) ter kako jih zaobiti, npr. z gensko spremenjenimi sortami s prilagojenimi transporterji za dano snov (Palmgren s sod. 2008). Uspešno povečanje koncentracije Zn v žitih bi lahko pomenilo boljšo preskrbo z mineralom pri ljudeh, ki se sicer prehranjujejo z manj raznoliko prehrano, ki temelji na žitih. V našem poskusu smo testirali, ali lahko z namakanjem zrn prosa v raztopini $ZnCl_2$ s Zn biofortificiramo kalice. Zrna smo namakali v različnih koncentracijah $ZnCl_2$ in opazovali njegov vpliv na kalitev, rast in mineralno sestavo rastlin. V biomasi rastlin, katerih zrna smo namakali v bolj koncentrirani raztopini $ZnCl_2$, smo pričakovali večjo koncentracijo Zn in Cl kot v tistih, ki so bile tretirane z raztopinami manjših koncentracij. Pričakovali smo tudi, da bo namakanje v $ZnCl_2$ pozitivno vplivalo na rast rastlin, ki se kaže kot povečanje biomase. Koncentracijo Zn in drugih elementov smo izmerili z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF).

Material in metode

Za eksperiment smo uporabili zrna prosa, kupljena leta 2020, ki jih pakira Semenarna Ljubljana. Izbrali smo petkrat po 300 nepoškodovanih zrn (4 eksperimentalne in ena kontrolna skupina) in jih oprali pod tekočo vodo. Štiri skupine smo za 24 ur namočili v raztopine z naraščajočo koncentracijo $ZnCl_2$ (0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM), kontrolno skupino pa za isti čas v vodno raztopino brez $ZnCl_2$ (0 mM). Namakali smo pri sobni temperaturi.

Za test kaljivosti smo iz vsake obravnave vzeli po 100 zrn in jih razporedili na pet petrijevok, po 20 zrn na vsako (Slika 1). Preostala zrna vsake obravnave smo razporedili v vnaprej določene pladnje z omočenim filtrirnim papirjem in jih prenesli v kalilnike s stabilno temperaturo (21°C) in visoko vlago (avtomatsko pršenje z vodno meglico). Sedmi dan smo skaljena zrna v petrijevkah prešteli in določili odstotek kaljivosti za vsako od skupin. Deset dni stare kalice (Slika 2) smo odstranili iz kalilnikov, banjice pa razdelili na približno štiri skupine, da smo dobili štiri ponovitve na obravnavo. Vsem kalicam smo ločili zeleni del od ostanka zrna in korenin ter jih stehali (sveža masa). Kalice smo sušili pri 60°C pet dni, ko smo jih ponovno stehali (suha masa).

Posušene kalice smo s pomočjo tekočega dušika strli v terilnici. Iz strtega materiala smo nato s hidravlično stiskalnico oblikovali tabletko. Za vsako obravnavo smo pripravili eno tabletko tako, da smo združili posušene kalice iz vseh 4 aluminijastih folij. Nato smo z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF) izmerili koncentracije fosforja (P), žvepla (S), klora (Cl), kalija (K), kalcija (Ca), mangana (Mn), železa (Fe) in cinka (Zn). Dobljene rezultate smo statistično obdelali. Opravili smo enosmerno analizo variance (ANOVA), ki ji je sledil Holm-Sidakov test pri $p < 0.05$ ($n = 4$).

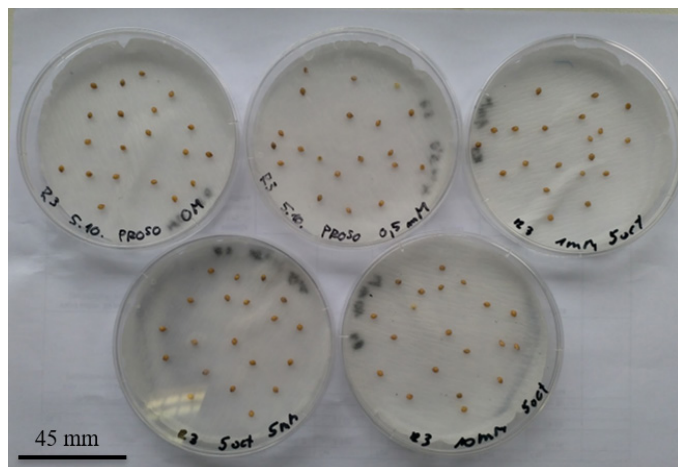
Rezultati

Po sedmih dneh kaljenja zrn smo prešteli zrna, ki so vzkli, izračunali povprečje za vsako obravnavo in rezultate prikazali v obliki deleža vzklih zrn (Slika 3).

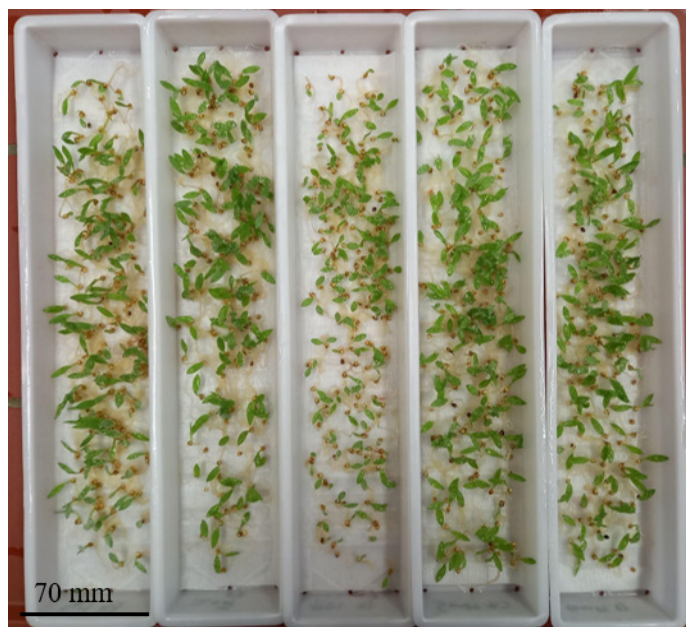
Po desetih dneh gojenja v kalilniku smo kalice vsake obravnave razdelili na štiri aluminijaste folije, ter vsako posebej stehali. Najmanjša sveža masa kalic je bila pri obravnavi 1 mM $ZnCl_2$ (Slika 4a). Podobno je bilo pri suhi masi kalic, le da se obravnava 0 mM in 1 mM nista več značilno razlikovali (Slika 4b).

Koncentracija P (Slika 5a) je bila pri kontrolni skupini statistično pomembno večja kot pri obravnavi z 10 mM raztopino $ZnCl_2$.

Koncentracija S (Slika 5b) je bila največja pri kontrolni skupini. Najmanjšo koncentracijo Fe smo izmerili pri obravnavi 10 mM



Slika 1: Reprezentativni primeri petrijevok za kalitveni test prosa (*Panicum milliaceum* L.), namakanih 24 ur v različnih koncentracijah cinkovega klorida (zgoraj od leve proti desni: 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, spodaj levo: 5 mM, spodaj desno: 10 mM). Na vsaki petrijevki je 20 zrn, za vsako obravnavo smo pripravili 5 petrijevok.

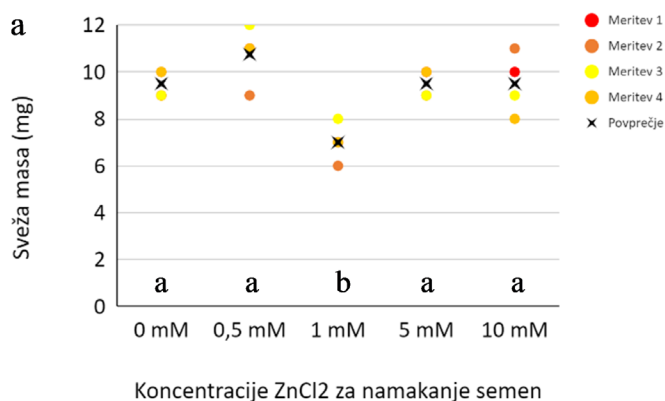


Slika 2: Deset dni stare kalice prosa (*Panicum milliaceum* L.), katerih zrna smo namakali 24 ur v različnih koncentracijah cinkovega klorida (od leve proti desni: 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM ter 10 mM).

ZnCl₂ (Slika 5c). Največjo koncentracijo Cl (Slika 5d) smo izmerili v kalicah iz obravnave 0,5 mM ZnCl₂, največjo koncentracijo K (Slika 5e) pa pri obravnavi 1 mM ZnCl₂. Koncentracija Zn je bila največja v kalicah iz obravnave 10 mM ZnCl₂ (Slika 5f); tej sta sledili obravnavi 0,5 in 5 mM ZnCl₂, najmanj Zn pa je vsebovala kontrola. Največjo koncentracijo Ca (Slika 5g) smo izmerili pri kontrolni skupini, sledili sta ji obravnavi 0,5 mM in 5 mM ZnCl₂, za njima pa obravnava 10 mM ZnCl₂. Najmanj Ca so vsebovale kalice iz obravnave 1 mM ZnCl₂. Največjo koncentracijo Mn (Slika 5h) smo izmerili v kontrolni skupini, manjša koncentracija Mn je bila pri obravnavah 5mM, 1mM ter 0,5mM ZnCl₂, najmanjša pa v obravnavi 10mM ZnCl₂.

Diskusija

Rast kalic v kalilniku je bila slabša, kot smo pričakovali. Proso je tolerantno na sušo, iz česar sklepamo, da so bili rastni pogoji zaradi prekomerne vlage v kalilniku morda suboptimalni. Že

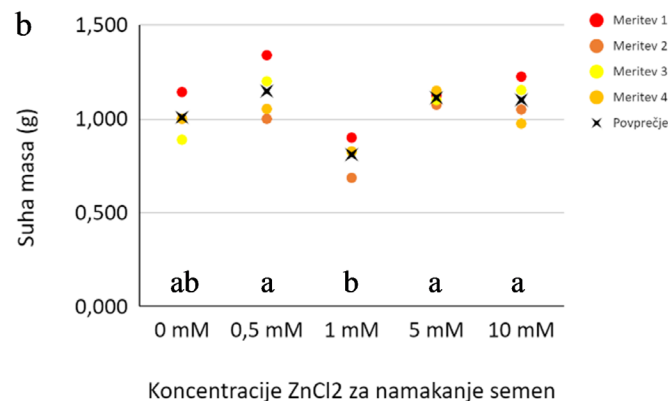


Slika 3: Test kaljivosti zrn prosa (*Panicum milliaceum* L.), ki smo jih namakali 24 ur pri sobni temperaturi v različnih koncentracijah cinkovega klorida (ZnCl₂).

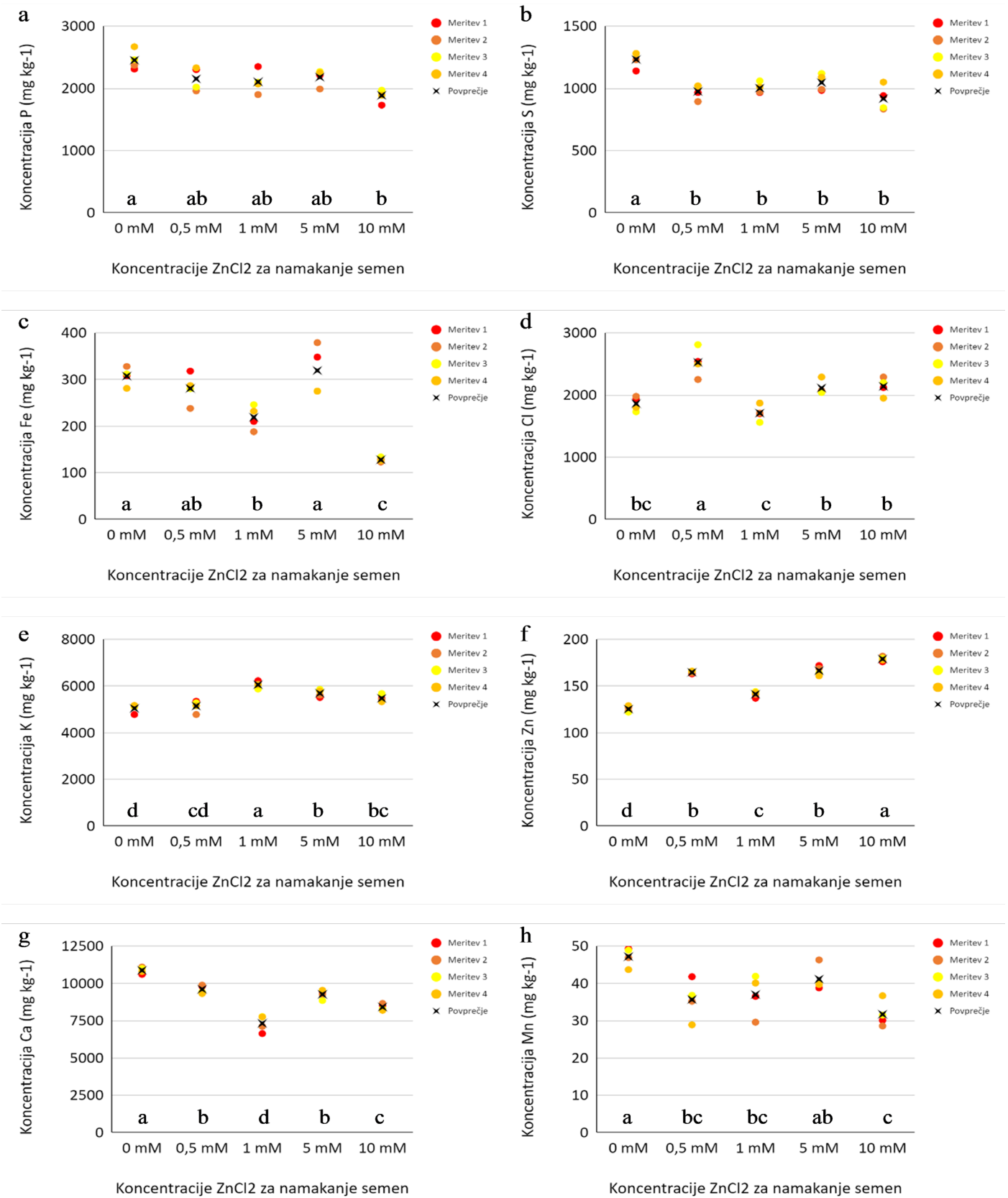
Briggs (1978) je ugotovil, da prekomerna količina vode zavira kaljenje in rast žit. S podaljšanjem časa kalitve s 7 na 10 dni smo upali na večjo biomaso kalic, vendar jih zaradi strahu pred plesnijo nismo vzgajali še dlje. Večja biomasa bi najbrž pripomogla k zanesljivejšim rezultatom - poskus bi bilo dobro ponoviti bodisi z večjim numerusom zrn bodisi v drugačnih kalitvenih razmerah.

Vplivu ZnCl₂ na kaljivost zrn prosa nismo zaznali. O vplivu ZnCl₂ na kaljivost semen arašidov poročajo Zhao in sod. (2020), ki so zaznali povečanje kaljivosti semen, tretiranih z nizkimi koncentracijami ZnCl₂ (20 mM), ter postopno manjšanje kaljivosti ob večanju koncentracije ZnCl₂ (t.j. pri 100 mM in 200 mM). Največja koncentracija ZnCl₂, s katero smo tretirali zrna prosa (10 mM), je še vedno manjša od najmanjše koncentracije, ki so jo uporabili Zhao in sod. (2020). Mogoče je, da bi vpliv na kaljivost zaznali ob povečanju koncentracije ZnCl₂.

Analize so pokazale, da različne koncentracije ZnCl₂ na svežo biomaso kalic niso imele pomembnega učinka, razen takrat, ko primerjamo maso kalic, katerih zrna smo namakali v 1 mM ZnCl₂, z ostalimi obravnavami. Možno je, da je pri meritvah prisotna napaka, lahko pa je težava v sami pripravi vzorca, saj nenadnega padca v masi kalic, namočenih pri 1 mM ZnCl₂, ne znamo pojasniti. Omenjene kalice namreč vsebujejo manj Zn



Slika 4: Masa svežih kalic (a) in suhih kalic (b) prosa (*Panicum milliaceum* L.), katerih zrna smo namakali 24 ur pri sobni temperaturi v različnih koncentracijah cinkovega klorida (ZnCl₂). Različne črke na posameznem grafu prikazujejo statistično značilne razlike, določene z enosmerno analizo ANOVA in Holm-Sidakovim testom (n = 4, p < 0,05).



Slika 5: Koncentracija a) fosforja (P), b) žvepla (S), c) železa (Fe), d) klorida (Cl), e) kalija (K), f) cinka (Zn), g) kalcija (Ca) in h) mangana (Mn) v kalicah prosa (*Panicum miliaceum* L.), katerega zrna smo namakali 24 ur pri sobni temperaturi pri različnih koncentracijah cinkovega klorida (ZnCl₂). Različne črke na grafih prikazujejo statistično značilne razlike, določene z enosmerno analizo ANOVA in Holm-Sidakovim testom (n = 4, p < 0,05).

kot kalice, tretirane s 5 mM raztopino, vendar pri teh nismo zaznali upada biomase. To dejstvo torej ne podpira razlage, da bi Zn pri obravnavi 1 mM raztopine $ZnCl_2$ na kaleča zrna deloval zaviralno.

Pred začetkom poskusa smo predvidevali, da bomo v biomasi rastlin, katerih zrna smo namakali v bolj koncentrirani raztopini $ZnCl_2$, zaznali večjo koncentracijo Zn, kot v tistih, ki so bila tretirana z manjšimi koncentracijami. Rezultati hipotezo potrjujejo. Največjo koncentracijo Zn smo zasledili v kalicah, katerih zrna smo namakali v 10 mM raztopini $ZnCl_2$, najmanjšo pa v kontrolni skupini. Biofortifikacija zrn prosa z namakanjem v raztopini $ZnCl_2$ se je izkazala za uspešno. Povečanje koncentracije Zn v zelenih delih rastlin po biofortifikaciji z namakanjem v $ZnCl_2$ so pokazali tudi pri arašidih. Koncentracija Zn v biofortificiranih rastlinah je bila kar 5-krat večja od kontrole (Zhao in sod. 2020). V naši raziskavi ni bilo tako očitnega povečanja koncentracije Zn, saj je največja uporabljena koncentracija za biofortifikacijo znašala le 10 mM, v poskusu Zhao in sod. pa 200 mM. V prihodnjih raziskavah bi lahko povečali koncentracije raztopine $ZnCl_2$ z namenom povečanja končne koncentracije Zn v kalicah s potencialnim povečanjem njihove biomase. Iz koncentracije Cl v kalicah nismo uspeli razbrati očitnega vzorca razlik v njegovi koncentraciji. Zn na nekatere minerale vpliva sinergistično (N, K), na druge pa antagonistično (P, Ca, Fe, Cu, Mn) (Prasad in sod. 2016, Mousavi s sod. 2012). Naši rezultati potrjujejo povečanje koncentracije K ob povečani koncentraciji Zn, vendar pa je statistično značilno povečanje opazno le pri koncentraciji 1 mM $ZnCl_2$, saj koncentracija K pri večjih koncentracijah $ZnCl_2$ zopet upade. Pri večjih koncentracijah $ZnCl_2$ morda negativno vpliva na privzem K v rastlino (deluje strupeno), vendar pa obstaja verjetnost, da bi za povečanje koncentracije K v rastlinah vse do koncentracije 10 mM $ZnCl_2$ bilo potrebnih le več ponovitev poskusa. Da Zn negativno interagira s P, Fe in Ca smo potrdili tudi v našem poskusu, saj smo v kalicah zabeležili zmanjšanje koncentracij P, Ca in Fe ob povečanju koncentracije $ZnCl_2$. Vendar pa so v naših rezultatih pri nekaterih koncentracijah $ZnCl_2$ opazna določena odstopanja, ki bi jih morda lahko odpravili s ponovitvijo poskusa. V literaturi so interakcije S in Zn opisane kot pozitivne in negativne, odvisno od vrstno specifičnih mehanizmov. Rezultati, pridobljeni z našo analizo, nakazujejo na negativno interakcijo Zn in S, vendar pa razlike v koncentraciji S niso statistično zelo značilne, saj je razlika v koncentraciji S opazna le pri prehodu iz kontrole na obravnave, ki imajo prisoten $ZnCl_2$, medtem ko med posameznimi koncentracijami $ZnCl_2$ razlike niso statistično značilne. Opažanje, da Zn zmanjša koncentracijo Mn v tkivih rastlin, katerih zrna so bila namakana v različnih koncentracijah Zn, so zabeležili tudi Mousavi s sod. (2012). V kontrolni skupini smo izmerili največjo koncentracijo Mn, medtem ko smo v kalicah iz obravnave 10 mM $ZnCl_2$ izmerili najmanjšo koncentracijo Mn. Rezultati korelirajo s tistimi, ki so jih v raziskavi dobili Mousavi s sod. (2012). Največja koncentracija Mn je bila v kontrolni skupini, saj zrna teh kalic niso bila namočena v $ZnCl_2$. V poskusu so Prasad s

sod. (2016) zaznali negativno interakcijo, ki jo razlagajo tako, da naj bi Zn z antagonističnimi elementi tvoril spojine, ki so težje dostopne koreninam rastlin oziroma se po rastlini težje transportirajo.

Zaključki

Rezultati našega poskusa kažejo na pravilnost domneve, da namakanje zrn prosa v raztopini $ZnCl_2$ vpliva na povečanje koncentracije Zn v biomasi kalic v odvisnosti od uporabljene koncentracije $ZnCl_2$ in da tretiranje z večjo koncentracijo $ZnCl_2$ privede do večje koncentracije minerala kot tretiranje z manj koncentrirano raztopino $ZnCl_2$. Menimo, da je tovrstna biofortifikacija obetavna metoda za povečanje količine Zn v prehrani ljudi.

Ker razlike v biomasi kalic med obravnavami niso bile statistično pomembne, je hipoteza o pozitivnem vplivu Zn na rast kalic zavrnjena. Dopusčamo možnost, da bi ob vzgoji večje biomase kalic opazili statistično pomembne razlike v biomasi kalic iz različnih obravnav.

Z večjimi koncentracijami $ZnCl_2$ bi lahko v prihodnje še povečali koncentracijo Zn v rastlinah in tako povečali tudi hranilno vrednost prosa, kar bi pomembno pripomoglo k odpravljanju pomanjkanja Zn v prehrani prebivalcev držav v razvoju ali pa v primeru uporabe rastlin prosa v krmi.

Literatura

1. Akhtar M, Yousaf S, Sarwar N, Hussain S, 2019. Zinc biofortification of cereals - role of phosphorus and other impediments in alkaline calcareous soils. *Environmental Geochemistry and Health* 41:2356–2379.
2. Briggs DE, 1978. *Barley*. Springer, Dordrecht, NL.
3. Cabot C, Martos S, Llugany M, Gallego B, Tolrà R, Poschenrieder C, 2019. A role for zinc in plant defense against pathogens and herbivores. *Frontiers in Plant Science* 10:1-15.
4. Cakmak I, Kutman UB, 2018. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. *European Journal of Soil Science* 69:172–180.
5. Chattha MU, Hassan MU, Khan I, Chattha MB, Mahmood A, Nawaz M, Subhani MN, Kharal M, Khan S, 2017. Biofortification of wheat cultivars to combat zinc deficiency. *Frontiers in Plant Science* 8:281.
6. Mousavi SR, Galavi M, Rezaei M, 2012. The interaction of zinc with other elements in plants: a review. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 4 (24):1881-1884.
7. Palmgren MG, Clemens S, Williams LE, Krämer U, Borg S, Schjørring JK, Sanders D, 2008. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in Plant Science* 9:464–473.
8. Prasad R, Shivay Y, Kumar D, 2016. Interactions of zinc with other nutrients in soils and plants-A review. *Indian Journal of Fertilisers* 12:16-26.
9. Wessells KR, Brown KH, 2012. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: Results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. *PLoS One* 7:e50568.
10. Zhao K, Zhao C, Yang M, Yin D, 2020. $ZnCl_2$ treatment improves nutrient quality and Zn accumulation in peanut seeds and sprouts. *Scientific Reports* 10:2364.

Biofortifikacija kalic ječmena s cinkom

Tanja Kobal¹, Nika Kozoderc², Irina Modrušan², Luka Žeželj²

¹Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Študij ekologije in biodiverzitete, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

²Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Študij molekulske in funkcionalne biologije, Večna pot 111, 1000 Ljubljana.

- Namen raziskave je bil ugotoviti, ali namakanje zrn ječmena (*Hordeum vulgare* L.) v raztopini cinkovega klorida ($ZnCl_2$) statistično značilno vpliva na kalitev in mineralno sestavo kalic.
- Med poskusom so bila zrna ječmena izpostavljena raztopinam $ZnCl_2$ naraščajočih koncentracij (0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM). Iz dela izpostavljenih zrn smo ocenili kaljivost. Določili smo svežo in suho maso poganjkov po izpostavitvi. Z metodo rentgenske fluorescenčne spektrometrije smo v suhi masi kalic določili koncentracijo naslednjih elementov: fosfor (P), žveplo (S), klor (Cl), kalij (K), kalcij (Ca), mangan (Mn), železo (Fe) in cink (Zn). Za statistično obdelavo podatkov je bila uporabljena enosmerna ANOVA, ki ji je sledil Holm-Sidakov post-hoc test pri $p < 0,05$.
- Rezultati so pokazali, da ni statistično značilnih razlik v povprečni sveži in suhi masi kalic ter v povprečnem številu skaljenih zrn ječmena med posameznimi obravnavami. S statistično analizo smo ugotovili, da ima izpostavitve zrn ječmena raztopini $ZnCl_2$ statistično značilen vpliv na koncentracijo Zn v suhi masi kalic, medtem ko na koncentracijo ostalih elementov ni imelo statistično značilnega vpliva.
- Namakanje zrn ječmena v raztopini $ZnCl_2$ se je izkazalo za potencialno uspešno metodo biofortifikacije, saj smo pri 10 mM izpostavitvi dosegli 2-kratno povečanje koncentracije Zn glede na kontrolo.

Ključne besede: $ZnCl_2$, rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRF), elementna sestava, kalilniki, mikrohranila

Uvod

Ocenjujemo, da po svetu več kot dve milijardi ljudi trpi za pomanjkanjem mikrohranil. Kot posledica monotone prehrane, ki temelji predvsem na osnovnih kmetijskih pridelkih, kot so na primer žita, se najpogosteje pojavljata pomanjkanje Fe in Zn. Pomanjkanje kateregakoli izmed hranil se lahko kaže kot bolezensko stanje. Dokazano je, da pomanjkanje Zn v kombinaciji s pomanjkanjem Fe lahko povzroči zaostajanje v rasti pri otrocih, anemijo in celo večje tveganje za okužbo z nalezljivimi boleznimi (WHO 2009).

V izogib bolezenskim stanjem, ki se lahko razvijejo zaradi pomanjkanja hranil, bi bilo potrebno vzgajati poljščine, ki vsebujejo dovolj visoke koncentracije mikrohranil. Sama prisotnost mikrohranil v hrani sicer še ni zagotovilo, da so ta hranila biološko razpoložljiva (Detterbeck s sod. 2016), zato tečejo številne raziskave, ki se ukvarjajo z lokalizacijo in identifikacijo hranil v užitnih delih kmetijskih rastlin.

Detterbeck s sod. (2020) so med drugim pokazali, da se pojavljajo razlike v kopičenju Zn med različnimi sortami ječmena (*Hordeum vulgare* L.), še posebej so bile razlike izražene v endospermu in alevronu. Opazili so tudi postopno zmanjševanje koncentracij Zn od alevrona do endosperma. Železo je v zrnu ječmena kolokalizirano s P v alevronu, medtem ko je Zn kolokaliziran z S v podalevronu.

Za odpravo prikrite lakote svetujejo tri strategije: biofortifikacijo, fortifikacijo hrane in prehranska dopolnila. Najcenejša in dostopna tudi revnim populacijam je biofortifikacija, ki se je že precej dobro uveljavila v zadnjem času (Welch in Graham 2004). Biofortifikacija je proces povečanja vsebnosti mikrohranil v užitnih delih živilih s konvencionalnim križanjem rastlin, agronomskimi tehnikami ali s sodobnimi biotehnološkimi metodami. Ključen korak pri razvoju biofortificiranih poljščin je določitev ciljnih vrednosti hranil, kar je pretežno odvisno od (1) biotransformacije ali biodostopnosti zaužitih hranil, (2) stabilnosti mikrohranil po temperaturni obdelavi, procesiranju ali shranjevanju, (3) zahtev ciljne populacije po določenih mikrohranilih in (4) od potencialne ravni zaužitja teh pridelkov s strani ciljne populacije (Cakmak s sod. 2010).

Zaradi podnebnih sprememb prihaja tudi do prilagajanja kmetijskih strategij, ki se vse bolj usmerjajo v pridelavo odpornejših kulturnih rastlin s čim manjšo izgubo, ki bolje prenašajo stres in so bolj prilagodljive podnebnim razmeram. Ječmen je pridelok, ki ustreza slednjim zahtevam in hkrati ima tudi visoko hranilno vrednost (Sakellariou in Mylona 2020). Ječmen velja za eno izmed najbolj bogatih žit z različnimi elementi, kot so Fe (21,9 – 66,2 mg kg⁻¹), Zn (10,4 – 38,1 mg

kg⁻¹), Ca (186 – 978 mg kg⁻¹), Mg (1050 – 2024 mg kg⁻¹), P (2273 – 5429 mg kg⁻¹), K (3532 – 7722 mg kg⁻¹), in Cu (1,51 – 9,87 mg kg⁻¹). Dosedanje raziskave kažejo, da ima biofortifikacija pri ječmenu največji potencial ravno pri Fe in Zn (Gyawali s sod. 2019).

Tekom naše raziskave smo poskušali ugotoviti, ali lahko z namakanjem zrn ječmena v ZnCl₂ pozitivno vplivamo na kaljivost in mineralno sestavo kalic, tj. jih biofortificiramo.

Materiali in metode

Zrna ječmena (*Hordeum vulgare* L.) smo namočili v destilirano vodo (kontrola) in v raztopine naraščajočih koncentracij ZnCl₂ (0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM) pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo del zrn prenesli v petrijevke (20 semen na petrijevko) z omočenim filter papirjem za oceno kaljivosti pri posamezni obravnavi, preostanek pa porazdelili v pet banjic in kalilnice z banjicami prenesli v rastno komoro (16/8 urna dolžina dneva, stalni pogoji: 21 °C, 60 % vlaga). Po sedmih dneh smo določili število kalic v petrijevkah in iz kalilnikov ločili poganjke od korenin (štiri vzorce poganjkov na banjico) za sušenje s povprečno 4,5 g sveže mase poganjkov. Vzorce poganjkov smo sušili v sušilniku pri 60 °C sedem dni oz. dokler niso bili popolnoma posušeni.

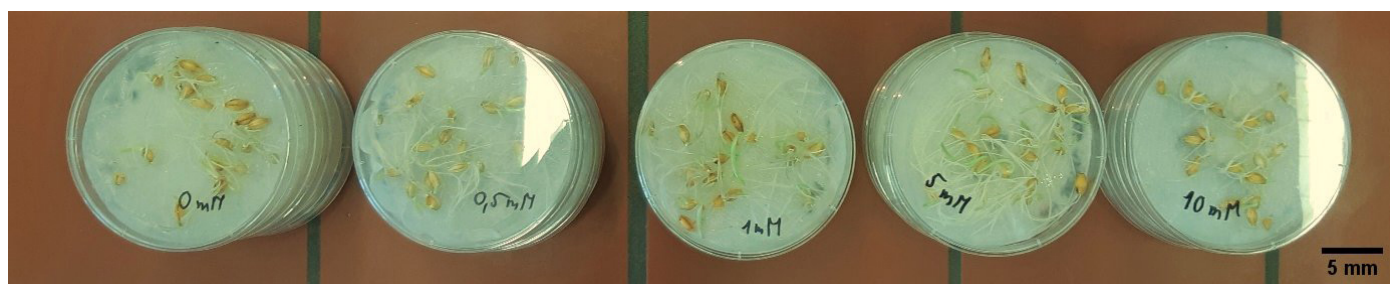
Posušene poganjke smo ponovno stehali, jih drobno narezali in strli v terilnici s pomočjo tekočega dušika. Iz uprašenega rastlinskega materiala smo s pomočjo hidravlične stiskalnice pripravili tabletko (zaradi velike količine biomase smo pripravili po dve tabletki premera 2,5 cm na obravnavo). Tabletko smo stehali in jim z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF) izmerili koncentracijo posameznih elementov (P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe in Zn).

Rezultate smo statistično obdelali s pomočjo enosmerne ANOVE in ob statistično značilno različnih vplivih obravnav na merjene parametre izvedli Holm-Sidakov post-hoc test pri p < 0,05 v programu SigmaPlot (vers. 12.0) (Systat Software Inc., London, UK).

Rezultati

Določili smo povprečno število skaljenih zrn po izpostavitvi s ZnCl₂ (n=5, Slika 1). Ugotovili smo, da ni statistično značilnih razlik med posameznimi obravnavami v povprečnem številu skaljenih zrn (p = 0,062), torej izpostavitve različnim koncentracijam raztopine ZnCl₂ ne vpliva na kaljivost. Povprečno je skalilo 80 % zrn ječmena.

Določili smo svežo in suho maso kalic ječmena ter povprečne vrednosti mas po izpostavitvi različnim koncentracijam raztopin ZnCl₂ (Preglednica 1). Ugotovili smo, da ni statistično



Slika 1: Skaljena zrna ječmena (*Hordeum vulgare* L.) sedem dni po namakanju v različnih raztopinah ZnCl₂ naraščajočih koncentracij (od leve proti desni si sledijo obravnave: kontrola (0 mM), 0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM), pri katerih smo določali oceno kaljivosti (tj. povprečno število skaljenih zrn ječmena na obravnavo).

Preglednica 1: Sveža in suha masa pri posameznih obravnavah z raztopino $ZnCl_2$ ($n=4$) in p-vrednost pridobljena z enosmerno ANOVA.

	0 mM	0,5 mM	1 mM	5 mM	10 mM	p-vrednost
Sveža masa [g]	0,103 ($\pm 0,0028$)	0,104 ($\pm 0,0034$)	0,109 ($\pm 0,0064$)	0,102 ($\pm 0,0035$)	0,0956 ($\pm 0,0109$)	0,085
Suha masa [g]	0,0114 ($\pm 0,0012$)	0,0113 ($\pm 0,0009$)	0,0126 ($\pm 0,0003$)	0,0113 ($\pm 0,0010$)	0,0106 ($\pm 0,0014$)	0,157

**Slika 2:** Rast in razvoj kalic ječmena (*Hordeum vulgare* L.), katerih zrna smo namakali v raztopini $ZnCl_2$ naraščajočih koncentracij (0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM) in destilirani vodi (kontrola) 24 ur pri sobni temperaturi; (a) zrna ječmena po namakanju v raztopini $ZnCl_2$ različnih koncentracij, ki smo jih razporedili v banjice, (b) sedem dni stare kalice ječmena, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam raztopin $ZnCl_2$.

značilnih razlik v povprečni sveži in suhi masi kalic ječmena. Kalice so bile zdrave in vse enakomerno zelene (Slika 2). Statistična analiza je pokazala, da je izpostavitve zrn ječmena raztopini $ZnCl_2$ imela statistično značilen vpliv na koncentracijo Zn v suhi masi kalic ječmena. Ni bilo statistično značilne razlike v koncentraciji Zn med obravnavami z 0,5 mM in 1 mM raztopino $ZnCl_2$ ter kontrolo, medtem ko pri obravnavah z 5 mM in 10 mM raztopino $ZnCl_2$ obstajajo statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo in obravnavami z 0,5 mM in 1 mM raztopino $ZnCl_2$ (Slika 3h). Analiza koncentracije ostalih preiskovanih elementov (P, S, Cl, K, Ca, Mn in Fe) v suhi masi kalic ječmena po izpostavitvi z raztopino $ZnCl_2$ različnih koncentracij ni pokazala statistično značilne razlike med obravnavami in kontrolo, z izjemo Zn pri katerem smo dobili statistično značilno razliko pri $p < 0,001$ (Slika 3a-g).

Diskusija

Biofortifikacija je proces, s katerim povečamo naravno vsebnost razpoložljivih hranil v rastlinah poljščin (Welch 2005). Rastline so običajno na začetku prehranjevalnih verig, zato je uspešno povečanje privzema mineralov iz tal in njihove biološke uporabnosti v užitnih delih rastlin pomembno tako za ljudi kot tudi za živali, ki jih s takšnimi rastlinami krmimo in posledično vplivamo tudi na kvaliteto hrane živalskega izvora (Hirschi 2008).

Kljub vsemu lahko tekom biofortifikacije naletimo na več izzivov, v literaturi pa sta posebej izpostavljena dva: (1) pridobiti moramo rastline, ki imajo v svojih užitnih delih povečano vsebnost esencialnih mineralov, hkrati pa se s tem ne poveča vsebnost strupenih elementov in (2) preprečiti

je potrebno sekvestracijo hranil v neužitnih delih rastlin (na primer v koreninah) (Palmgren s sod. 2008).

V naši raziskavi smo pokazali, da lahko z namakanjem ječmenovih zrn v $ZnCl_2$ uspešno povečamo koncentracijo Zn v kalicah. Za to je potrebna vsaj 5 mM koncentracija $ZnCl_2$. Pri tem pa nismo opazili statistično značilnega vpliva namakanja zrn v $ZnCl_2$ na koncentracijo ostalih preiskovanih elementov (P, S, Cl, K, Ca, Mn in Fe) v suhi masi kalic, kar je skladno tudi z dosedanjimi ugotovitvami na tem področju (Bhatt 2020). Znano je, da privzem elementov v rastlinah poteka na dva načina, z neprekinjeno absorpcijo skozi korenine v tleh in transportom se nalaga v poganjke, v semena pa s prerazporeditvijo iz vegetativnih delov, kjer je element nakopičen v fazi polnjenja zrna (Ramireddy 2018). Sakaellariou in Mylona (2020) sta ugotovila, da translokacija elementov iz listov v fazi polnjenja bolj prispeva k porazdelitvi elementa v zrnih v primerjavi s ponovnim vnosom iz tal, zato bi bilo v prihodnje potrebno več pozornosti posvetiti tudi izboljšanju privzema Zn preko korenin in translokacijo do izbranih delov poganjkov. Zn se sicer v zrna nalaga po floemu, kar določa koncentracije Zn v samem zrnju.

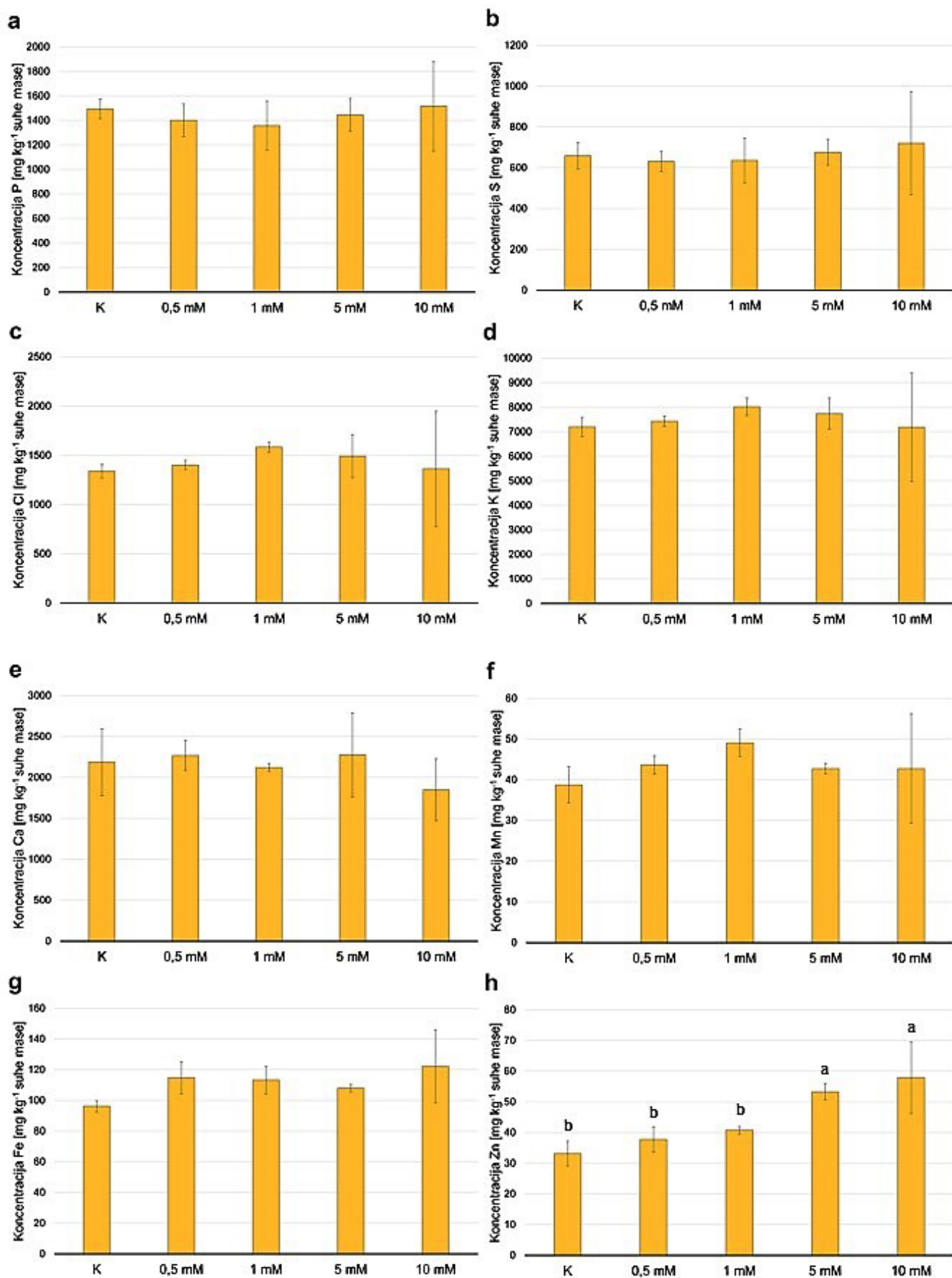
Iz našega poskusa izhaja, da namakanje zrn v $ZnCl_2$ ne vpliva na kaljivost in suho maso kalic ječmena, kar je še posebej pomembno pri aplikaciji takšnih postopkov v kmetijsko in živilsko prakso. V nadaljevanju bi bilo zanimivo preveriti, ali to vpliva na maso zrn v naslednji generaciji in vsebnost Zn (ter drugih hranil), saj le-ta predstavlja tudi vir za prehrano. Preiskovani način biofortifikacije je torej ustrezen za povečanje koncentracije Zn v kalicah ječmena, hkrati pa ne vpliva negativno na koncentracije drugih mineralnih hranil v njih in na uspešnost kalitve. Z apliciranjem te tehnike v kmetijsko prakso bi lahko povečali koncentracijo Zn v zrnih in posledično rešili (vsaj delno) problem prikrite lakote.

Zaključek

Z našo raziskavo smo ugotovili, da biofortifikacija kalic ječmena z namakanjem zrn v raztopini $ZnCl_2$ statistično značilno ne vpliva na kalitev in na svežo ter suho maso kalic. Namakanje zrn ječmena v 5 mM in 10 mM raztopini $ZnCl_2$ je imelo značilen vpliv na koncentracijo Zn v kalicah ječmena, pri namakanju zrn v 10 mM raztopini $ZnCl_2$ smo določili kar 2-kratno povečanje v koncentraciji Zn glede na kontrolo. Namakanje zrn v raztopini $ZnCl_2$ ni imelo statistično značilnega vpliva na koncentracijo drugih preiskovanih makro- in mikrohranil v kalicah. Namakanje zrn ječmena v 5 mM in 10 mM raztopini $ZnCl_2$ se je izkazalo za potencialno uspešno metodo biofortifikacije, vendar ostaja odprto vprašanje potencialnega vpliva višjih koncentracij raztopine $ZnCl_2$ na razpoložljivost Zn.

Literatura

- Bhatt R, Hossain A, Sharma P. 2020. Zinc biofortification as an innovative technology to alleviate the zinc deficiency in human



Slika 3: Koncentracije (mg kg⁻¹ suhe mase) fosforja (P), žvepla (S), klora (Cl), kalija (K), kalcija (Ca), mangana (Mn), železa (Fe) in cinka (Zn) v kalih ječmena (*Hordeum vulgare* L.) in standardne napake pri različnih obravnavaх (n=4), tj. koncentracij raztopine ZnCl₂ (0 mM (kontrola), 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM), v katere smo namakali zrna ječmena 24 ur pri sobni temperaturi. Črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med obravnavaми, kar smo določili z enosmerno ANOVA in Holm-Sidakov post-hoc testom (p < 0,05; n=4).

- health. *Open Agriculture*, 5:1. <https://doi.org/1.1515/opag-2020-0018> (15. dec. 2021)
2. Cakmak I, Pfeiffer HW, McClafferty B. 2010. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chemistry*, 87, 1: 10-20. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-87-1-0010> (15. dec. 2021)
 3. Detterbeck A, Pongrac P, Persson DP, Vogel-Mikuš K, Kelemen M, Vavpetič P, Pelicon P, Arčon I, Husted S, Kofod Schjoerring J, Clemens S. 2020. Temporal and spatial patterns of zinc and iron accumulation during barley (*Hordeum vulgare* L.) grain development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 44: 12229-12240. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04833> (14. dec. 2021)
 4. Detterbeck A, Pongrac P, Rensch S, Reuscher S, Pecovnik M, Vavpetič P, Pelicon P, Holzheu S, Kramer U, Clemens S. 2016. Spatially resolved analysis of variation in barley (*Hordeum vulgare*) grain micronutrient accumulation. *New Phytologist*, 211: 1241–1254. <https://doi.org/10.1111/nph.13987> (14. dec. 2021)
 5. Gyawali S, Otte ML, Jacob DL, Abderrazek J, Singh Verma RP. 2019. Multiple element concentration in the grain of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) collection, *Journal of Plant Nutrition*, 42, 9: 1036-1046. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1589507> (14. dec. 2021)
 6. Hirschi K. 2008. Nutritional improvements in plants: time to bite on biofortified foods. *Trends in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.05.009> (16. dec. 2021).
 7. Palmgren MG, Clemens S, Williams LE, Krämer U, Borg S, Schjørring JK, Sanders D. 2008. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in Plant Science*, 13, 9: 464-473. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.06.005> (16. dec. 2021)
 8. Ramireddy E, Galuszka P, Schmölling T. 2018. Zn-fortified cereal grains in field-grown barley by enhanced root cytokinin breakdown. *Plant Signaling & Behavior*, 13, 11, e1530023. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1530023> (15. dec. 2021)
 9. Sakellariou M, Mylona VP. 2020. New uses for traditional crops: the case of barley biofortification. *Agronomy*, 10, 1964: 2-13. doi:10.3390/agronomy10121964 (15. dec. 2021)
 10. Welch RM, Graham RD. 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*, 55, 396: 353–364. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh064> (14. dec. 2021)
 11. Welch RM. 2005. Biotechnology, biofortification, and global health. *Food and Nutrition Bulletin*, 26: 419–421. <https://doi.org/10.1177/15648265050264S309> (16. dec. 2021)
 12. WHO. 2009. Global Health Risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44203> (14. dec. 2021)

Učinek ekstrakta iz semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) na rast izbranih vrst gliv

Natalija Pavlinjek, Neža Praček, Katja Stanovšek, Samuel Žvanut

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

- Namen naše raziskave je bil ugotoviti vpliv ekstrakta iz semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) na rast kolonij izbranih gliv: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Epicoccum nigrum* in *Didymella* sp.
- Pripravili smo ekstrakt iz neoluščenih semen tatarske ajde in etanola ter ga dodali gojišču PDA. Na pripravljeno gojišče smo posamično nacepili 5 različnih vrst gliv. Plošče smo inkubirali v rastni komori in spremljali rast gliv. S pomočjo računalniške analize fotografij v programu ImageJ smo kvantificirali velikost glivnih kolonij. Rezultate smo statistično obdelali s pomočjo dvosmerne ANOVA analize in izvedli neparametrični Dunn-Sidakov post hoc test pri $p < 0,0001$ v programu Microsoft Excel z orodjem XLSTAT.
- Potrdili smo, da ekstrakt semen tatarske ajde inhibira rast vseh testiranih gliv, razen glive *Alternaria alternata*. Ekstrakt je v primerjavi s kontrolo pri večini gliv zmanjšal hitrost rasti. Občutljivost vseh gliv na ekstrakt se je zmanjšala tekom poskusa.
- Ekstrakt tatarske ajde bi lahko uporabili za zatiranje določenih vrst rastlinskih patogenih gliv, kar bi prispevalo k rešitvi problema prekomerne uporabe sintetičnih fitofarmaceutskih sredstev. Pred uporabo v omenjene namene bi bile potrebne nadaljnje raziskave protiglivnega učinka na gojenih rastlinah.

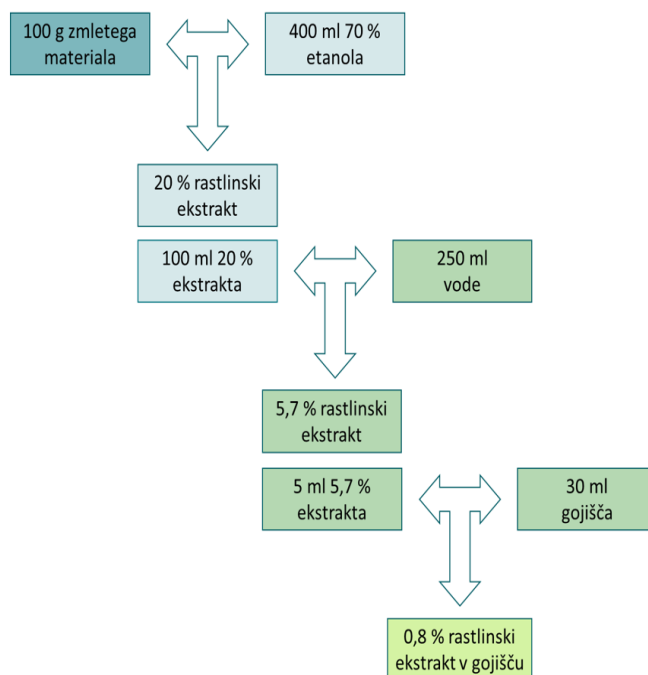
Ključne besede: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Epicoccum nigrum*, *Didymella* sp., inhibicija rasti

Uvod

Rastlinske patogene glive predstavljajo resen problem v kmetijstvu, saj botrujejo zmanjšanju količine in kakovosti pridelka (Savary s sod. 2019). Glivne okužbe prizadenejo žita in psevdožita na polju ali pri shranjevanju (Mravlje s sod. 2021). Izdelki iz neokuženih rastlin imajo daljši rok uporabe v trgovinah, kar prispeva k večjim dobičkom in manj zavržene hrane (Zabka in Pavela 2013). Na polju žita okužijo predvsem glive iz rodov *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* in *Rhizopus*, pri shranjevanju pa predvsem *Aspergillus* in *Penicillium*. Velik problem glivnih okužb semen so tudi toksični sekundarni metaboliti, ki jih glive proizvajajo, imenovani mikotoksini. Pri človeku akutne okužbe vodijo v bolezen, lahko celo smrt, kronične izpostavitve pa povzročajo genotoksičnost, mutacije in raka (Mravlje s sod. 2021).

Ajda je dvokaličnica iz družine Polygonaceae (Ruan s sod. 2011). Na Kitajskem sega pridelava ajde v 1. oziroma 2. stoletje pred našim štetjem. Poznamo 27 vrst ajde, vendar se le navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*) in tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum*) uporabljata kot kulturni rastlini (Tang s sod. 2016). Danes je ajda tradicionalna poljščina v Evropi in Aziji. V Evropi, pa tudi drugod po svetu, se pridelava ajde povečuje, saj je primerna za ekološko pridelavo, ki stremi k trajnostnemu in okolju prijaznemu kmetijstvu ter omejeni uporabi gnojil in pesticidov. Na popularnosti pridobiva tudi zaradi visoke hranilne vrednosti in visoke vsebnosti fenolov. Ne vsebuje glutena, zato je primerna tudi za ljudi s celiakijo (Mravlje s sod. 2021). Tatarska ajda izhaja iz goratih območij zahodne Kitajske. Je bolj odporna na mraz in bolje tolerira sušo kot navadna ajda (Luthar s sod. 2021). Hrana pripravljena iz tatarske ajde nas varuje pred nekaterimi kroničnimi boleznimi kot so debelost in kardiovaskularne bolezni, ima protivnetne, antikancerogene ter antioksidativne učinke (Luthar s sod. 2021 in Koval s sod. 2020). Znižuje holesterol v krvi, uravnava krvni sladkor, lipide v krvi in krvni tlak (Ruan s sod. 2011). Za vegetarijance in vegane lahko ajda predstavlja pomemben vir proteinov zaradi uravnotežene vsebnost aminokislin (Luthar s sod. 2021). V primerjavi z navadno ajdo ima tatarska ajda višjo hranilno vrednost, vsebuje namreč več vitamina B (Bonafaccia s sod. 2003).

Človeška populacija naj bi se do leta 2050 povečala za 50 %, potrebe po žitaricah pa naj bi se do takrat podvojile (Tilman s sod. 2002). Globalizacija in podnebne spremembe povzročajo širjenje patogenov, družba pa se vedno bolj zaveda prednosti ekološko pridelane hrane. Zaradi teh razlogov bo v prihodnosti potrebno čim bolj zmanjšati glivne okužbe pridelkov. Danes spopadanje z glivnimi patogeni zahteva uporabo različnih pesticidov. Takšne metode zatiranja imajo velikokrat škodljiv učinek na ekosistem, hkrati pa številne patogene glive pridobijo odpornost in fungicidi niso več učinkoviti. Zaradi omenjenega je potrebno najti rešitve v alternativnih načinih preprečevanja glivnih okužb rastlin (Gondo s sod. 2020). Antioksidanti tatarske ajde zavirajo rast in razvoj gliv ter sintezo mikotoksinov (Zabka in Pavela 2013). Znano je, da snovi, ki jih vsebuje izvleček navadne ajde, delujejo fungicidno (Tamura s sod. 2017). Namen naše raziskave je bil ugotoviti ali izvleček iz semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) deluje inhibitorno na rast kolonij izbranih gliv: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Epicoccum nigrum* in *Didymella* sp.



Slika 1: Priprava rastlinskega ekstrakta iz semen tatarske ajde.

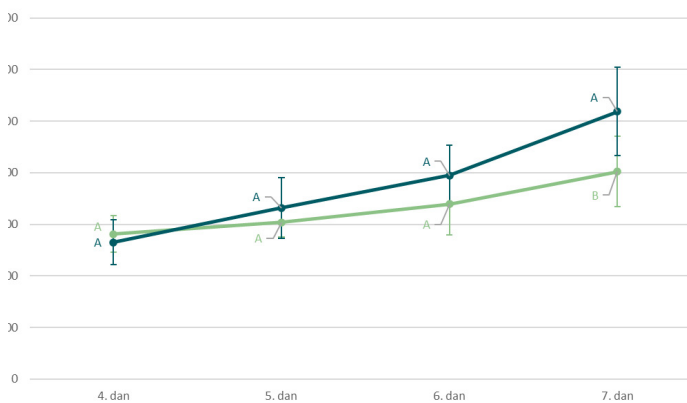
Materiali in metode

V mlinčku smo 3 min mleli 100 g neolučšenih semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*). Zmletim semenom smo dodali 400 ml 70 % etanola, premešali in dali v ultrazvočno kopel (20 °C, 30 min). Občasno smo zmes premešali. Zmes smo precedili preko kuhinjskega cedila in 200 µm sita. Ekstrakt smo centrifugirali 20 min, 10000 g. Supernatant smo 3,5-krat redčili z dH₂O in dodali v količini 5 ml/petrijevko, ki vsebuje 30 ml gojišča (Slika 1), tako da je bila končna koncentracija ekstrakta semen 0,8 %.

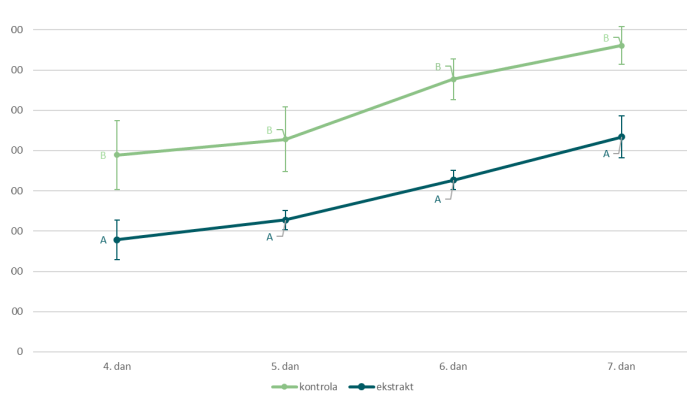
Pripravili smo gojišče PDA (potato dextrose agar) z dodanim agarjem in kloramfenikolom ($\gamma = 50 \mu\text{g}/\text{mL}$). Dodali smo dH₂O in avtoklavirali. Gojišče smo razlili na plošče premera 90 mm. Do uporabe smo plošče hranili v hladilniku.

Vsako izmed petih vrst gliv (*Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Epicoccum nigrum* in *Didymella* sp.) smo nacepili na 8 kontrolnih plošč (dodan samo etanol) in 8 plošč z ekstraktom. S spatulo smo izrezali približno 1 cm² velik košček gojišča z aktivno rastočim micelijem in ga položili na sredino plošče. Plošče smo inkubirali v rastni komori z dnevno-nočnim ritmom temperature 16 h na 23 °C in 8 h na 20 °C, v temi.

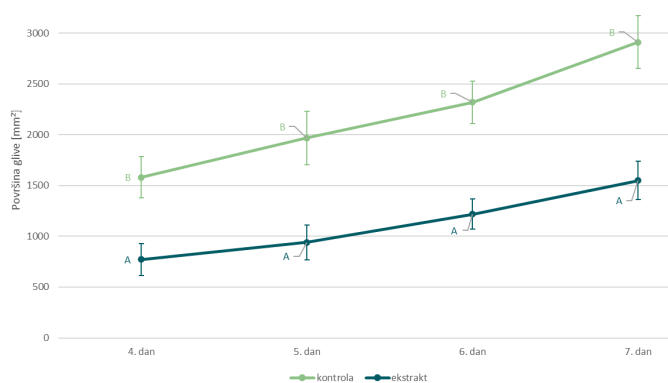
Po 4 dneh inkubacije smo plošče fotografirali in to ponovili še naslednje 3 zaporedne dni (5., 6. in 7. dan inkubacije). Z računalniško analizo fotografij v programu ImageJ (Schindelin s sod. 2012) smo kvantificirali velikost glivnih kolonij. Za mero velikosti smo izbrali površino glivne kolonije, iz pridobljenih rezultatov pa smo določili hitrost glivne rasti ter ocenili občutljivost glive na ekstrakt. Hitrost rasti gliv smo izračunali kot: (površina glive 7. dan - začetna površina nacepljene glive)/7 dni inkubacije. Občutljivost glive na ekstrakt smo izračunali kot: 1 - (površina glive na ekstraktu/površina glive na kontroli) na 4., 5., 6. in 7. dan rasti v odstotkih. Rezultate smo statistično obdelali s pomočjo dvosmerne ANOVA analize in izvedli neparametrični Dunn-Sidakov post



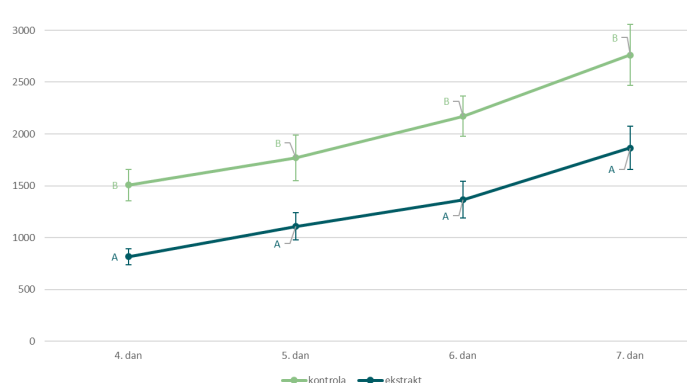
Slika 2: Dinamika rasti glive *Alternaria alternata* (AA2) med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti površin glive za posamezni dan opazovanja in standardni odklon. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike med skupinami za posamezni dan.



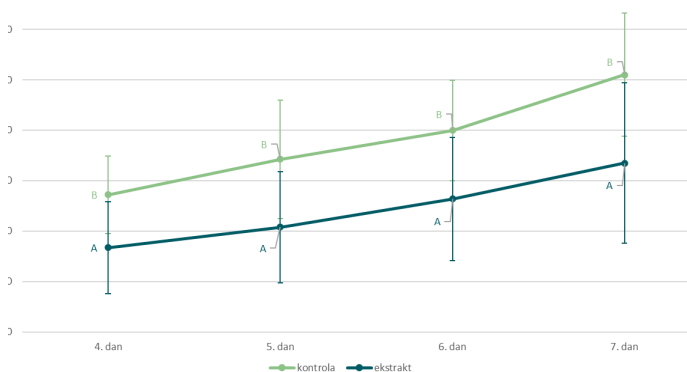
Slika 3: Dinamika rasti glive *Alternaria infectoria* (AI2) med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti površin glive za posamezni dan opazovanja in standardni odklon. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike med skupinami za posamezni dan.



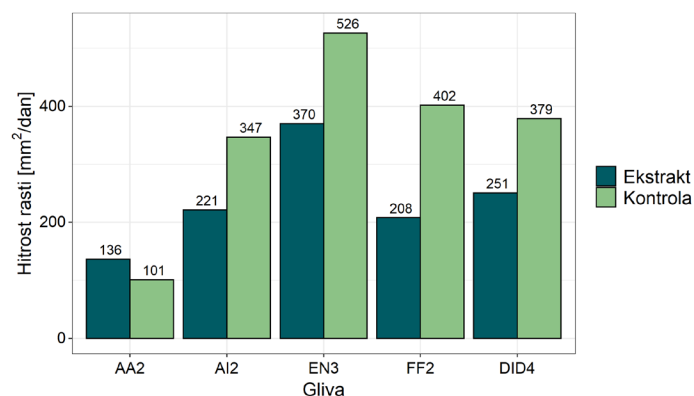
Slika 4: Dinamika rasti glive *Epicoccum nigrum* (EN3) med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti površin glive za posamezni dan opazovanja in standardni odklon. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike med skupinami za posamezni dan.



Slika 5: Dinamika rasti glive *Fusarium fujikuroi* (FF2) med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti površin glive za posamezni dan opazovanja in standardni odklon. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike med skupinami za posamezni dan.



Slika 6: Dinamika rasti glive *Didymella* sp. (DID4) med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti površin glive za posamezni dan opazovanja in standardni odklon. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike med skupinami za posamezni dan.

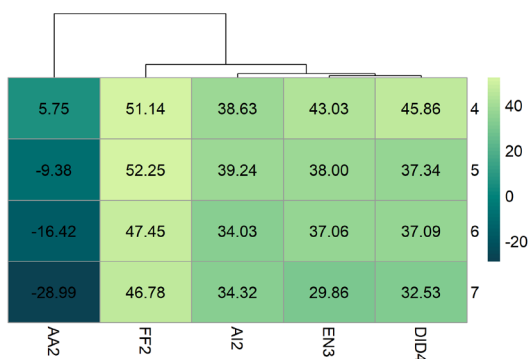


Slika 7: Hitrost rasti posamezne glive na ekstraktu in kontroli. Oznake gliv: *Alternaria alternata* (AA2), *Alternaria infectoria* (AI2), *Epicoccum nigrum* (EN3), *Fusarium fujikuroi* (FF2) in *Didymella* sp. (DID4). Nad stolpci je zapisana hitrost rasti posamezne glive v mm²/dan.

hoc test pri $p < 0,0001$ v programu Microsoft Excel z orodjem XLSTAT. Tako smo ugotovili, katere razlike so statistično značilne in katere ne. Podatke občutljivost gliv na ekstrakt smo grupirali s programom R (verzija 4.1.2).

Rezultati

Ugotovili smo, da je gliva *Alternaria alternata* (AA2) 7. dan rasti rasla bolje na gojišču z ekstraktom kot na kontrolnem gojišču



Slika 8: Občutljivost gliv na ekstrakt v odstotkih. Najnižja vrednost predstavlja neobčutljivost na ekstrakt. Negativne vrednosti pomenijo boljšo rast na ekstraktu kot na kontrolnem gojišču. Najvišje vrednosti pomenijo največjo občutljivost glive na ekstrakt. Oznake gliv: *Alternaria alternata* (AA2), *Alternaria infectoria* (AI2), *Epicoccum nigrum* (EN3), *Fusarium fujikuroi* (FF2) in *Didymella* sp. (DID4).

(Slika 2), pri preostalih meritvah (4., 5. in 6. dan) pa ni bilo statistično značilnih razlik.

V dinamiki rasti glive *Alternaria infectoria* (AI2) so vse dni opazovanja statistično značilne razlike med kontrolno in testno skupino, kar je razvidno iz Slike 3. Kontrolna skupina je rasla bolje kot skupina z dodanim ekstraktom.

V dinamiki rasti glive *Epicoccum nigrum* (EN3) so vse dni opazovanja statistično značilne razlike med kontrolno in testno skupino, kar je razvidno iz Slike 4. Kontrolna skupina je rasla bolje kot skupina z dodanim ekstraktom.

Rast glive *Fusarium fujikuroi* (FF2) na gojišču z ekstraktom je bila močno zavrta v primerjavi s kontrolo, kar je razvidno iz dinamike rasti te glive na Sliki 5. Razlike v rasti so za vse dni statistično značilne. Testna skupina je na ekstraktu rasla skoraj dvakrat počasneje od kontrolne.

Rast glive *Didymella* sp. (DID4) je bila na gojišču z ekstraktom zavrta v primerjavi s kontrolno skupino, kar je razvidno iz Slike 6. Za vse dni opazovanja rasti so bile ugotovljene statistično značilne razlike.

Hitrost rasti gliv je bila pri vseh glivah večja na kontroli kot na ekstraktu (Slika 7). Izjema je bila gliva *Alternaria alternata* (AA2), ki je hitreje rasla na ekstraktu. Hitrost rasti smo izračunali kot: (površina glive 7. dan - začetna površina nacepljene glive)/7 dni inkubacije.

Glive so različno občutljive na ekstrakt in so se nanj različno odzvale. Občutljivost gliv je bila izračunana kot: 1 - razmerje med površino glive na plošči z ekstraktom in površino glive na kontrolni plošči (Slika 8). Najbolj neobčutljiva na ekstrakt je bila gliva *Alternaria alternata* (AA2), najbolj občutljiva pa *Fusarium fujikuroi* (FF2). Glede na dendrogram vidimo, da je gliva *Alternaria alternata* (AA2) najbolj izstopala po občutljivosti na ekstrakt v primerjavi z ostalimi glivami, precej drugače se je obnašala tudi gliva *Fusarium fujikuroi* (FF2). Glive *Alternaria infectoria* (AI2), *Epicoccum nigrum* (EN3) in *Didymella* sp. (DID4) pa so se grupirale skupaj in se podobno odzvale na ekstrakt.

Diskusija

Znano je, da lahko ajdo shranjujemo precej dolgo časa brez

pojava simptomov ali sprememb v hranilni vrednosti. Razlog za to je predvsem visoka koncentracija številnih antioksidantov, ki varujejo seme pred glivnimi okužbami in posledično kontaminacijo z mikotoksini (Chitarrini s sod. 2014). Oksidativni stres in povišana koncentracija reaktivnih kisikovih vrst lahko pri nekaterih vrstah gliv povzroči povečano proizvodnjo mikotoksinov. Zaradi prisotnosti antioksidantov v pripravkih iz tatarske ajde bi te lahko uporabili tudi za zmanjšanje sinteze mikotoksinov (Koval s sod. 2020).

Ugotovili smo, da ekstrakt tatarske ajde deluje inhibitorno na rast večine testiranih gliv (Slika 2 - Slika 6). Učinek lahko pripišemo fenolnim spojinam, ki smo jih zaradi polarne narave izolirali z etanolom. Te vplivajo na razvoj micelijev in zmotijo sintezo proteinov in mikotoksinov (Kerene s sod. 2020). Porušijo tudi integriteto celične membrane, kar povzroči uhajanje ionov iz celice in tako inhibirajo rast glive (Koval s sod. 2020). Tatarska ajda ima višjo vsebnost fenolnih spojin kot navadna ajda (Chitarrini s sod. 2014). Višje koncentracije fenolnih spojin v ekstraktu povečajo protiglivi učinek (Kerene s sod. 2020). Poleg fenolov ajda vsebuje tudi veliko ostalih antioksidantov, ki lahko zmanjšajo mikrobo rast (Chitarrini s sod. 2014). Opazili smo, da je pri vseh glivah, razen pri glivi *Alternaria alternata*, hitrost rasti večja na kontroli kot na ekstraktu (Slika 7). Občutljivost glive na ekstrakt se je pri vseh glivah zmanjšala tekom poskusa (Slika 8).

Vrste iz rodu *Alternaria* so večinoma saprofitske glive, nekatere vrste pa so patogeni rastlin – nekrotrofi *A. alternata* in *A. infectoria* inficirata tudi ekonomsko pomembne rastline ter proizvajata mikotoksine (Wang s sod. 2020 in Kahl s sod. 2015). Ekstrakt iz semen tatarske ajde na rast glive *A. alternata* ni deloval inhibitorno – končna povprečna površina kolonij je bila celo večja na ploščah z ekstraktom kot na kontrolnem gojišču (Slika 2). Hitrost rasti na ekstraktu glede na kontrolo je bila pri omenjeni glivi povečana (Slika 7). Da je ekstrakt pozitivno deloval na rast glive, je razvidno tudi iz prikaza občutljivosti gliv na ekstrakt (Slika 8). Domnevni razlog za to so sladkorji in maščobne kisline, ki predstavljajo dodaten vir nutrientov v gojišču in so se najverjetneje izločili v ekstrakt zaradi narave izolacije. Ker je *A. alternata* endofit ajde, sklepamo, da ni občutljiva na metabolne produkte ajde, ki sicer zavirajo rast drugih testiranih gliv. Ekstrakt je deloval izrazito inhibitorno na rast *A. infectoria*, ki ni endofit ajde (Slika 3, Slika 7). Prav tako je zmanjšal hitrost rasti te glive v primerjavi s hitrostjo rasti na kontroli (Slika 7).

Epicoccum nigrum je saprofit, hkrati pa oportunistični patogen in fakultativni endosimbiont ter antagonist določenih rastlinskih patogenih gliv. Rastline varuje pred patogeni oziroma omili njihove učinke, poveča biomaso koreninskega sistema, njegovi ekstrakti inhibirajo določene patogene glive (Ogóreck s sod. 2020). Ugotovili smo, da je ekstrakt inhibiral rast te glive (Slika 4). Njena občutljivost na ekstrakt je bila v začetku poskusa kar 43 %. Občutljivost se je tekom poskusa glede na ostale glive najbolj zmanjšala – za več kot 10 % (Slika 8). Hitrost rasti na ekstraktu je bila precej manjša kot na kontrolnem gojišču (Slika 7).

Vrste iz rodu *Fusarium* so tako rastlinski kot humani patogeni. *F. fujikuroi* je pogost rastlinski patogen, ki povzroča bolezen na rižu imenovano bakanae, v zadnjem času pa povzroča boleznijo tudi na drugih ekonomsko pomembnih rastlinah (Cen s sod. 2020). Ekstrakt iz semen tatarske ajde je zaviral rast kolonij *F. fujikuroi* (Slika 5). Dotična gliva je izkazala največjo občutljivost

na ekstrakt. Povprečna površina kolonij na gojišču z ekstraktom je bila na zadnji dan inkubacije kar 47 % manjša kot pri kontroli (Slika 8). Občutljivost na ekstrakt prav tako ni bistveno padala tekom poskusa in je bila v primerjavi z ostalimi glivami najbolj stabilna (Slika 8). Razlika v hitrosti rasti med ekstraktom in kontrolo je bila pri tej glivi največja – na ekstraktu je bila hitrost rasti skoraj dvakrat manjša kot na kontroli (Slika 7). Podobno so ugotovili tudi Keriene in sodelavci – tako ekstrakt iz luščin kot iz semen navadne ajde zmanjša rast kolonij gliv iz rodu *Fusarium*. Dokazali so zmanjšano rast gliv *F. culmorum* in *F. graminearum* na PDA gojišču z dodanim ekstraktom v primerjavi s kontrolo. Protiglivni učinek ekstrakta iz oluščanih semen je bil sicer šibkejši, kar sovпада s tem, da imajo luščine višjo vsebnost in raznolikost fenolnih spojin (Keriere s sod. 2020). Zaključki omenjene raziskave podpirajo naše ugotovitve in kažejo na visoko občutljivost gliv iz rodu *Fusarium* na ekstrakt iz ajde. Glive iz rodu *Didymella* so pomembni rastlinski patogeni, ki povzročajo bolezni na vseh rastlinskih organih in pri zelo raznolikih rastlinskih vrstah (Ren s sod. 2019). Naši rezultati kažejo, da je *Didymella* sp. občutljiva na ekstrakt (Slika 6, Slika 8). 4. dan opazovanja je bila površina kolonij na ekstraktu kar 46 % manjša kot pri kontroli, vendar se je njena občutljivost precej zmanjšala tekom poskusa - za več kot 10 % (Slika 8). Hitrost rasti je bila veliko večja na kontroli kot na ekstraktu (Slika 7).

Zaključki

Uporaba rastlinskih ekstraktov za preprečevanje glivnih okužb v kmetijstvu lahko v prihodnosti pomembno prispeva k povečanju donosa, varnosti in kakovosti pridelkov ter zmanjšanju negativnih vplivov na okolje. Rezultati naše raziskave kažejo, da ekstrakt tatarske ajde deluje inhibitorno na testirane glive z izjemo vrste *Alternaria alternata*, ki ni občutljiva nanj. Zaključimo lahko, da bi z ekstraktom iz tatarske ajde lahko zavirali in kontrolirali rast določenih patogenih gliv na kulturnih rastlinah ter pridelkih. Aplikacija za namen zatiranja patogenih gliv pa zahteva še nadaljnje raziskave na gojenih rastlinah.

Literatura

- Bonafaccia G, Marocchini M, Kreft I, 2003. Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry* 80(1):9–15.
- Cen YK, Lin JG, Wang YL, Wang JY, Liu ZQ, Zheng Y G, 2020. The Gibberellin Producer *Fusarium fujikuroi*: Methods and Technologies in the Current Toolkit. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:232.
- Chitarrini G, Nobili C, Pinzari F, Antonini A, De Rossi P, Del Fiore A, Procacci S, Tolaini V, Scala V, Scarpari M, Reverberi M, 2014. Buckwheat achenes antioxidant profile modulates *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology* 189:1–10.
- Gondo Y, Kamada I, Kihara J, Ueno M, 2020. Antifungal activity of leaf extracts from several buckwheat varieties against plant pathogenic fungi. *Bulletin of the Faculty of Life and Environmental Science Shimane University* 25:27-30.
- Kahl SM, Ulrich A, Kirichenko AA, Müller MEH, 2015. Phenotypic and phylogenetic segregation of *Alternaria infectoria* from small-spored *Alternaria* species isolated from wheat in Germany and Russia. *Journal of Applied Microbiology* 119(6):1637–1650.
- Keriere I, Mankeviciene A, Blazyte J, 2020. The effect of antifungal extracts on the contamination of grain with microfungi. *Food Science and Nutrition* 8(3):1375–1382.
- Koval D, Plocková M, Kyselka J, Skřivan P, Sluková M, Horáčková Š, 2020. Buckwheat Secondary Metabolites: Potential Antifungal Agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68(42):11631–11643.
- Luthar Z, Golob A, Germ M, Vombergar B, Kreft I, 2021. Tartary Buckwheat in Human Nutrition. *Plants* 10(4):700.
- Mravljje J, Regvar M, Starič P, Mozetič M, Vogel-Mikuš K, 2021. Cold Plasma Affects Germination and Fungal Community Structure of Buckwheat Seeds. *Plants* 10(5):851.
- Ogórek R, Przywara K, Piecuch A, Cal M, Lejman A, Matkowski K, 2020. Plant–Fungal Interactions: A Case Study of *Epicoccum nigrum* Link. *Plants* 9(12):1–23.
- Ren Y, Li D, Zhao X, Wang Y, Bao X, Wang X, Wu X, Wang D, Song B, Chen Z, 2019. Whole genome sequences of the tea leaf spot pathogen *Didymella segeticola*. *Phytopathology* 109(10):1676–1678.
- Ruan JJ, Chen H, Shao JR, Wu Q, Han XY, 2011. An antifungal peptide from *Fagopyrum tataricum* seeds. *Peptides* 32(6):1151–1158.
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A, 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution* 3(3):430–439.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A, 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9(7):676–682.
- Tamura T, Uchida K, Kihara J, Ueno M, 2017. Efficacy of buckwheat straw extracts against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Bulletin of the Faculty of Life and Environmental Science Shimane University* 22:17-20.
- Tang Y, Ding MQ, Tang YX, Wu YM, Shao JR, Zhou ML, 2016. Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat In: Zhou s sod. (ur.) Part 2. Germplasm Resources of Buckwheat in China. Academic Press, Cambridge, MA.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S, 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418(6898):671–677.
- Wang R, Zhao P, Ge X, Tian P, 2020. Overview of *Alternaria alternata* Membrane Proteins. *Indian Journal of Microbiology* 60(3):269–282.
- Zabka M, Pavela R, 2013. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* 93(6):1051-1056.

Učinek ekstrakta iz semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) na rast izbranih gliv

Marija Kravanja, Monika Širca, Ana Skledar, Danijela Herga

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

- Z raziskavo smo poskušali ugotoviti vpliv ekstrakta semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) na rast izbranih patogenih gliv (*Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Epicoccum nigrum*, *Didymella* sp.).
- Iz semen navadne ajde smo pripravili alkoholni ekstrakt, ki smo ga dodali v sveža gojišča. Na gojišča smo nacepili patogene glive (*Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Epicoccum nigrum*, *Didymella* sp.). Opazovali smo rast glivnih kolonij v prisotnosti ekstrakta ajde in kontrolnih kolonij (brez ekstrakta) ter merili njihovo površino.
- Naši rezultati nakazujejo zavirajoč učinek ekstrakta navadne ajde na rast patogenih gliv, z izjemo glive *Alternaria alternata*, ki je endofit navadne ajde.
- V ajdi prisotni polifenoli na rast in razvoj gliv delujejo inhibitorno. Alkoholni ekstrakt navadne ajde gliv sicer ne uniči popolnoma, vendar znatno zavre njihovo rast.

Ključne besede: etanolni rastlinski ekstrakti, glivna rast, *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Epicoccum nigrum*, *Didymella* sp.

Uvod

Ajda (*Fagopyrum* sp.) je psevdožito iz družine dresnovk (Polygonaceae). Ker ne vsebuje glutena in ima odličen profil makro- in mikrohranil, sodi med najpomembnejše alternative žit v človekovi prehrani (Pongrac s sod., 2013). Najbolj znani in preučeni vrsti sta navadna (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.). Odlikuje ju vsebnost številnih bioaktivnih snovi, denimo fenolov, ki med drugim sodelujejo pri ohranjanju zdravja človeka (Giménez-Bastida in Zieliński, 2015), saj delujejo antioksidativno, protivnetno, protitumorsko in protidiabetično (Giménez-Bastida in Zieliński, 2015; Jing s sod., 2016; Kreft, 2016). S fitofiziološkega vidika gre za spojine, ki jih rastlina sintetizira za zaščito pred UV-B sevanjem. UV-absorbirajoče spojine, ki jih najdemo v navadni ajdi, so npr. rutin, triclin, kampferol, luteolin in apigenin, ki absorbirajo sevanje v območju od 280–400 nm (Breznik s sod., 2005).

Pri razvoju rastlin ajde igrajo ključno vlogo glivni endofiti. Te najdemo v vseh delih rastline in so zelo raznoliki (Faeth in Fagan, 2002). Vplivajo lahko na kvaliteto semen, zato je informacija o vsebnosti endofitov v semenih zelo pomembna. Nekatere glive namreč sintetizirajo mikotoksine, ki so škodljivi za zdravje človeka oz. genotoksični. Poleg tega lahko toksini in zunajcelični encimi gliv inhibirajo kalitev semena ali posredno poslabšajo njihovo kakovost. Dokazano je bilo, da v semenih ajde najdemo okoli 30 vrst različnih glivnih endofitov iz 22 različnih rodov (Kovačec s sod., 2016).

Pri delu smo uporabili pet vrst gliv:

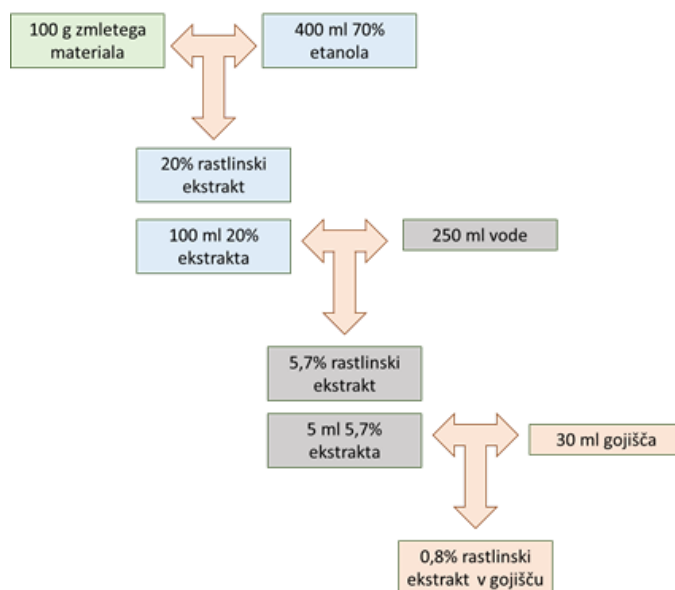
- *Alternaria alternata* (povzročiteljica listne pegavosti, mikotoksigena plesen - potencialni humani patogen),
- *Fusarium fujikuroi* (patogen žitaric (povzročiteljica 'bakanae' bolezni riža), mikotoksigena plesen - potencialni humani patogen) (Jackson in Al-Taher, 2008),
- *Epicoccum nigrum* (saprofitska plesen, povzročiteljica alergijskih respiratornih motenj pri človeku) (Bisht s sod., 2000),
- *Alternaria infectoria* (endo- ali saprofit, oportunistični patogen, pri ljudeh povzroča alergije, seneni nahod, infekcije dihalnega trakta) (Taralova s sod., 2011),
- *Didymella* sp. (fitopatogen, povzročiteljica trohnenja stebela).

Zanimalo nas je, ali semena navadne ajde vsebujejo snovi, ki zavirajo rast izbranih glivnih patogenov, zato smo jih izpostavili z etanolnimi ekstrakti navadne ajde. Za etanolne ekstrakte smo se odločili, ker v vodnih ekstraktih ostanejo tudi snovi kot so npr. sladkorji in aminokisliline, ki bi lahko z vplivom na rast gliv motile naš poskus oz. vplivale na njegov rezultat. Prav tako z etanolnim ekstraktom bolje ekstrahiramo nepolarne sekundarne metabolite s potencialno protiglivo aktivnostjo.

Materiali in metode

Priprava alkohalnega ekstrakta

Pripravili smo alkoholni ekstrakt iz semen navadne ajde: 100 g mletega zrnja navadne ajde smo prelili s 400 mL 70% etanola (20% rastlinski ekstrakt), zmes homogenizirali z mešanjem ter jo za 30 minut postavili v toplo vodno kopel (20°C). Da bi se znebili večjih delcev, smo ekstrakt prefiltrirali skozi kuhinjsko cedilo in nato skozi sito z odprtiniami 200 µm in centrifugirali 20 min pri 10 000 g. Ekstrakt smo redčili 3,5 x in dodali v



Slika 1: Shema priprave rastlinskega ekstrakta iz zrn navadne ajde.

gojišče v količini 5 ml/ petrijevko, ki vsebuje 30 ml gojišča (Slika 1).

Glivni poskus

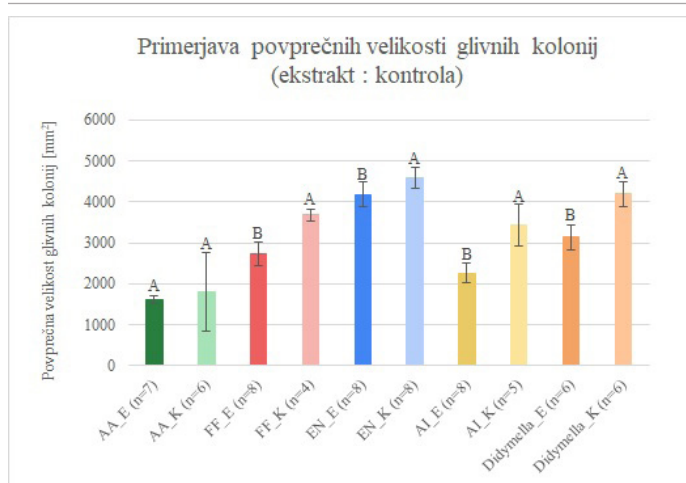
Pripravili smo sveže gojišče s krompirjevo dekstrozo (PDA) z dodanim antibiotikom kloramfenikol v koncentraciji 50 µg/mL. Po avtoklaviranju (1,5 h) smo gojišče ohladili in dodali etanolni ekstrakt semen navadne ajde (Slika 1) ter ga razlili v 40 sterilnih petrijevok s premerom 9 cm. Kontrolne petrijevke (40) smo napolnili z enakim gojiščem, vendar z dodanim 5 ml 20% etanola/ petrijevko. Koščke micelija vsake izmed 5 izbranih gliv (*Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Epicoccum nigrum*, *Didymella* sp.) smo nacepili na 8 petrijevok z ekstraktom in 8 kontrolnih petrijevok. Inkubacija v rastni komori je potekala 12 dni, in sicer v temi pri temperaturi 20°C. Po nacepljanju gliv smo vsa gojišča vsakodnevno fotografirali. Gojišča, na katerih smo zaznali neželene okužbe z neznanimi plesnimi, smo izločili iz analize. Glivno rast smo določali iz izmerjene površine kolonij. Meritve so bile opravljene s pomočjo programa ImageJ.

Statistična obdelava podatkov

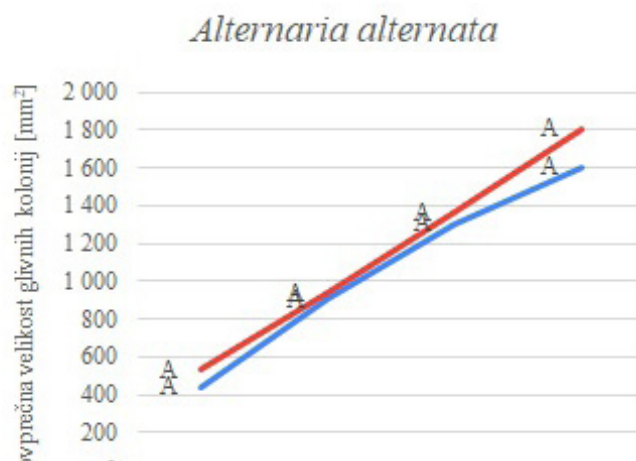
Za statistično obdelavo podatkov ter njihov grafični prikaz smo uporabili Microsoft Office Excel 2016 z dodatkom XLSTAT. S pomočjo slednjega smo z enosmerno analizo variance (ANOVA) in Dunn-Sidakovim testom pri $p < 0,01$ določili statistično značilne razlike med gojišči z dodanim ekstraktom in kontrolnimi gojišči.

Rezultati

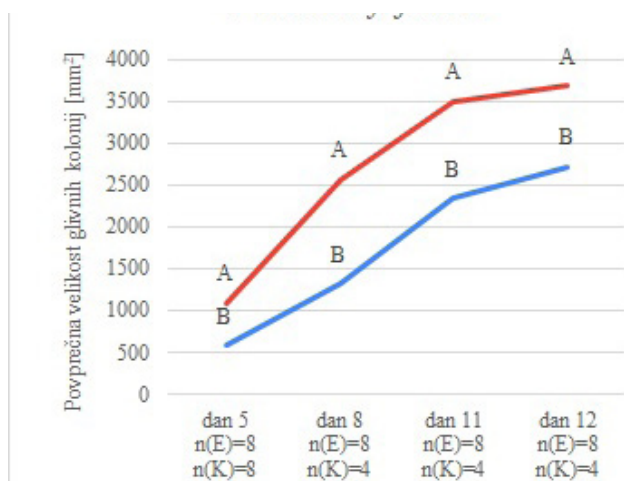
Ugotovili smo, da izbrane glive na enako pripravljenih gojiščih rastejo bolj oz. manj uspešno (Slika 2). Najhitrejšo



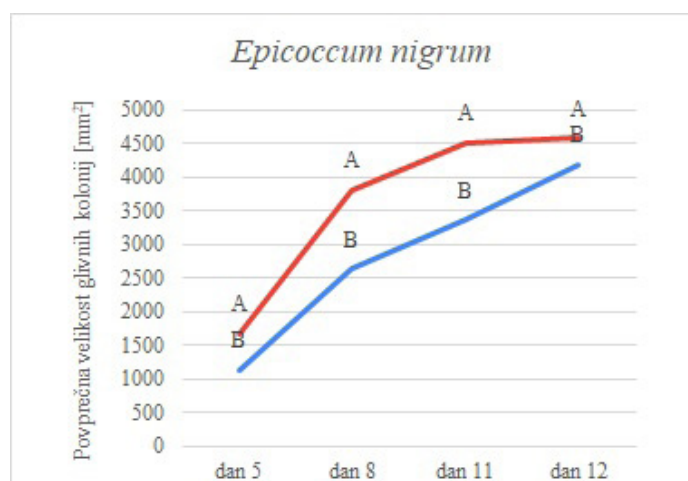
Slika 2: Primerjava povprečnih velikosti glivnih kolonij na gojiščih z dodanim ekstraktom navadne ajde (E) in kontrolnih gojiščih (K) ob koncu poskusa. Vrsta imena gliv so zapisana s katicami (AA - *Alternaria alternata*, FF - *Fusarium fujikuroi*, EN - *Epicoccum nigrum*, AI - *Alternaria infectoria*, *Didymella* - *Didymella* sp.). Različni črki (A in B) pri posamezni vrsti označujeta statistično značilne razlike.



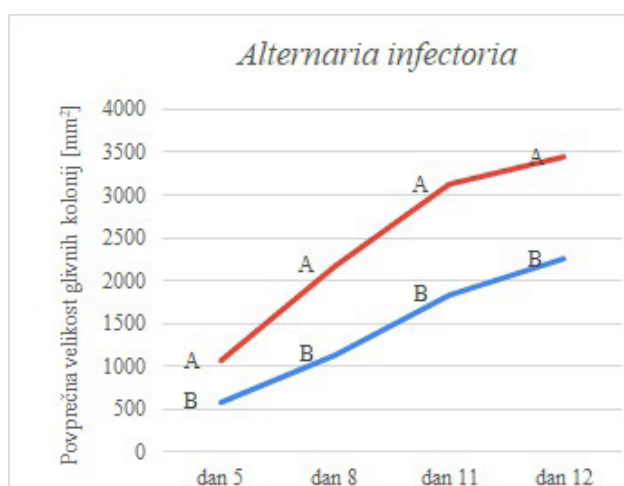
Slika 3: Dinamika rasti glive *Alternaria alternata*.



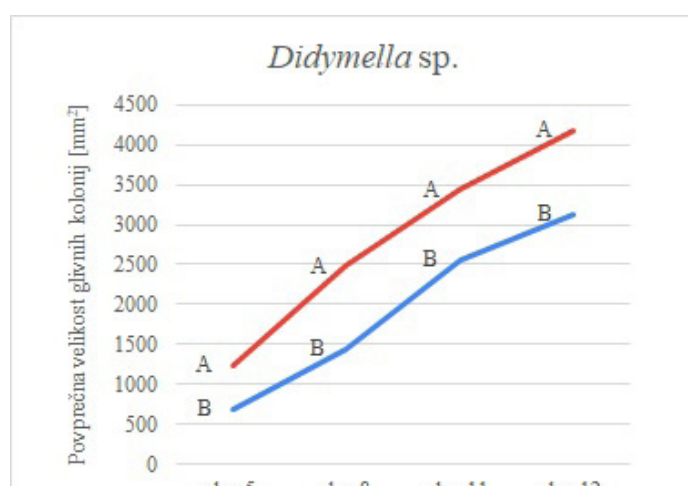
Slika 4: Dinamika rasti glive *Fusarium fujikuroi*.



Slika 5: Dinamika rasti glive *Epicoccum nigrum*.



Slika 6: Dinamika rasti glive *Alternaria infectoria*.



Slika 7: Dinamika rasti glive *Didymella* sp.

rast smo zabeležili pri vrsti *Epicoccum nigrum*, najpočasnejšo pa pri *Alternaria alternata*. Pri glivi *Didymella* sp. je bila razlika povprečnih velikosti kolonij na gojiščih z ekstraktom

v primerjavi s kontrolnimi gojišči največja peti dan po nacepljanju, pri vrstah *Alternaria alternata* in *Epicoccum nigrum* šesti dan, pri vrstah *Fusarium fujikuroi* in *Alternaria*

infectoria pa osmi dan. Razlik stopnje rasti na gojiščih z dodanim ekstraktom navadne ajde in kontrolnih gojiščih med različnimi vrstami ne moremo primerjati.

Slika 3 prikazuje dinamiko rasti glive *Alternaria alternata* peti, osmi, enajsti in dvanajsti dan po izpostavitvi. Razlike povprečnih velikosti glivnih kolonij na gojiščih z dodanim ekstraktom in kontrolnih gojiščih niso statistično značilne, čeprav je na dvanajsti dan inkubacije nekoliko nakazan trend manjše rasti gliv, obdelanih z ekstraktom, v primerjavi s kontrolnimi glivami.

Na Sliki 4, ki prikazuje dinamiko rasti glive *Fusarium fujikuroi* peti, osmi, enajsti in dvanajsti dan po izpostavitvi, so razlike povprečnih velikosti glivnih kolonij na gojiščih z dodanim ekstraktom in kontrolnih gojiščih statistično značilne, kar označujejo različne črke (A, B). Ekstrakt navadne ajde je zavrl rast glive.

Slika 5 prikazuje dinamiko rasti glive *Epicoccum nigrum* peti, osmi, enajsti in dvanajsti dan po izpostavitvi. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med kontrolo (A) in obravnavo z ekstraktom (B). Alkoholni ekstrakt navadne ajde je zavrl rast glive, razlika je bila največja na osmi dan inkubacije.

Na Sliki 6, ki ponazarja dinamiko rasti glive *Alternaria infectoria* peti, osmi, enajsti in dvanajsti dan po izpostavitvi, so razlike povprečnih velikosti glivnih kolonij na gojiščih z dodanim ekstraktom in kontrolnih gojiščih statistično značilne, kar označujejo različne črke (A, B). Ekstrakt navadne ajde je zavrl rast glive.

Dinamika rasti glive *Didymella* sp. je prikazana na Sliki 7. Že peti dan po izpostavitvi so bile razlike povprečnih velikosti glivnih kolonij na gojiščih z dodanim ekstraktom in kontrolnih gojiščih statistično značilne, prav tako tudi osmi, enajsti in dvanajsti dan, kar označujejo različne črke (A - kontrola, B - ekstrakt). Ekstrakt navadne ajde je torej zavrl rast glive.

Diskusija

Rastlinska alelopatija je proces, pri katerem organske spojine, ki jih izloča ena vrsta, vplivajo na rast in razvoj drugih rastlin (Szwed s sod., 2019). Dokazano je, da imajo korenine navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) alelopatski učinek na rast nekaterih trav (*Apera spica-venti* L., *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv., *Galium aparine* L.). Korenine ajde lahko na rast okoliških rastlin vplivajo tudi po odstranitvi nadzemnega dela rastline (Szwed s sod., 2019). V navadni ajdi alelopatijo povzročajo predvsem alkaloidi, maščobne kisline in fenolne spojine (Szwed s sod., 2019), med njimi še posebej polifenoli, kamor spadajo flavonoidi (npr. rutin in kvercetin) (Vombergar s sod., 2017). Flavonoidi imajo pomembno vlogo v signalnih verigah pri interakciji med arbuskularnomikorizno (AM) glivo in gostiteljem ter specifične vplive glede na rod in vrsto AM glive. Med okužbo rastline povečajo količino fenolnih spojin za odstranjevanje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in/ali za povečanje vključitve in navzkrižnega povezovanja fenolnih spojin s celično steno. Spremembe celične stene lahko delujejo kot fizična ovira za glive in/ali motijo razgradnjo komponent celične stene, ki so pogosto vir hranil za glive (Kovačec, 2016). Vsebnost rutina variira tako v rastlinah kot v semenih, odvisna pa je od genotipa, pa tudi od rastnih razmer (Vombergar s sod., 2017). Rutin lahko zavira rast in razmnoževanje nekaterih parazitov, bakterij, gliv in virusov. Prisotnost rutina pri navadni ajdi ne povzroči popolne inhibicije gliv, vendar pa lahko upočasnijo njihovo rast in zmanjša velikost kolonij (Kalinova s

sod., 2007).

Predvidevamo, da je prišlo do alelopatskega učinka med gojiščem, ki je vsebovalo ekstrakt navadne ajde, v katerem je med drugim prisoten rutin, ter glivami *Didymella* sp., *Fusarium fujikuroi*, *Epicoccum nigrum* in *Alternaria infectoria*, saj smo zaznali statistično značilne razlike v razrasti med glivami v gojiščih z ekstraktom in kontrolnih gojiščih; povprečna velikost glivnih kolonij je bila pri vseh štirih vrstah večja v kontrolnih gojiščih.

Določene rastline, ki so v mikoriznem odnosu z glivo, imajo večjo alelopatsko sposobnost v primerjavi z glivami brez mikorizne povezave. Med take vrste sodi renski glavinec (*Centaurea stoebe*), ki ima v simbiozi z glivo *Alternaria alternata* dvakrat večji alelopatski učinek kot rastlina brez mikorizne povezave (Aschehoug s sod., 2014). Rastline se lahko z alelopatijo ščitijo tudi pred okužbami gliv in drugih patogenov (Kong s sod., 2004; Liu s sod., 2008). Seme navadne ajde je kolonizirano z različnimi vrstami endofitskih gliv, katerih sestava in pogostost se tekom skladiščenja spreminja. Do zdaj so odkrili 36 različnih glivnih vrst, povezanih s semeni ajde, vključno z *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* in *Botrytis cinerea* (Kovačec, 2016). Encimi za razgradnjo celične stene so pomembni in bistveni pri vdoru glive v rastlino in vzpostavljanju simbioze, saj to olajša vstop glive v gostiteljsko rastlino in tako zagotavlja hranila, potrebna za glivno rast. Pomen celulazne aktivnosti za glivno patogenost se kaže v višji proizvodnji celulaz v virulentnih izolatih *A. alternata* v primerjavi z avirulentnimi izolati (Kovačec, 2016). Prav *A. alternata* in ostale endofitne glive spodbujajo rast in povečano sintezo rutina pri navadni ajdi (Zhao s sod., 2014). Ker je *A. alternata* edina iz našega nabora gliv dokazano endofit navadne ajde (Kovačec, 2016), smo predvidevali, da ekstrakt navadne ajde ne bo vplival na njeno razrast. Hipotezo smo potrdili, saj razlika v uspevanju na gojišču z ekstraktom in kontrolnim gojiščem pri tej glivi ni bila statistično značilna. V skladu z našimi pričakovanji se je uspešnost rasti glivnih kolonij glede na vrsto razlikovala. Najhitrejšo začetno rast smo zabeležili pri vrsti *Epicoccum nigrum* in *Fusarium fujikuroi*, najpočasnejšo pa pri *Alternaria alternata* in *Didymella* sp. Pri slednji je bila razlika povprečnih velikosti kolonij na gojiščih z ekstraktom v primerjavi s kontrolnimi največja peti dan po nacepljanju, pri vrstah *Alternaria alternata* in *Epicoccum nigrum* šesti dan, pri vrstah *Fusarium fujikuroi* in *Alternaria infectoria* pa osmi dan. Razlik stopnje rasti na gojiščih z dodanim ekstraktom navadne ajde in kontrolnih gojiščih med različnimi vrstami ne moremo primerjati. Predpostavljamo, da je do razlik v hitrosti rasti micelija med različnimi glivami prišlo, ker imajo različne vrste različne obrambne mehanizme, zato so se različno odzivale na fenolne spojine, prisotne v ekstraktu semen navadne ajde.

Zaključki

Zaključimo lahko, da imajo semena navadne ajde na izbrane vrste, ki niso njene endofitske glive, precej močan protiglivni učinek. Rutin in druge spojine, prisotne v semenu navadne ajde, namreč zavrejo njihov razvoj. Ker je *Alternaria alternata* edina gliva iz našega nabora, ki je endofit semen navadne ajde, ekstrakt nanjo ni imel tako močnega učinka kot na ostale štiri vrste gliv. Izvleček semen navadne ajde in njegov protiglivni učinek bi lahko potencialno pripomogel k zatiranju patogenih gliv. Ker gre za ekstrakt naravnega izvora, bi ga lahko, npr. za

obdelavo zrnja pred skladiščenjem, aplicirali tudi v ekološki pridelavi.

Literatura

- Aschehoug E. T., Callaway R. M., Newcombe G., Tharayil N., in Chen S. (2014). Fungal endophyte increases the allelopathic effects of an invasive forb. *Oecologia*, 175(1), 285–291. <https://doi.org/10.1007/S00442-014-2891-0>
- Bisht V., Singh B. P., Arora N., Sridhara S., in Gaur S. N. (2000). Allergens of *Epicoccum nigrum* grown in different media for quality source material. *Allergy*, 55(3), 274–280. <https://doi.org/10.1034/J.1398-9995.2000.00371.X>
- Breznik B., Germ M., Gaberščik A., in 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.
- 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. <https://doi.org/10.1093/ICB/42.2.360>
- Giménez-Bastida J. A., in Zieliński H. (2015). Buckwheat as a Functional Food and Its Effects on Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(36), 7896–7913. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.5B02498>
- Jackson L. S., in Al-Taher F. (2008). Factors Affecting Mycotoxin Production in Fruits. *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, 75–104. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374126-4.00004-8>
- 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). <https://doi.org/10.3390/IJMS17040589>
- Kalinova J., Vrchotova N., in Triska J. (2007). Exudation of Allelopathic Substances in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6453–6459. <https://doi.org/10.1021/JF070795U>
- Kong C., Xu X., Zhou B., Hu F., Zhang C., in Zhang M. (2004). Two compounds from allelopathic rice accession and their inhibitory activity on weeds and fungal pathogens. *Phytochemistry*, 65(8), 1123–1128. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2004.02.017>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2016.03.003>
- Kreft M. (2016). Buckwheat phenolic metabolites in health and disease. *Nutrition Research Reviews*, 29(1), 30–39. <https://doi.org/10.1017/S0954422415000190>
- Liu X., Chen Q., Wang Z., Xie L., in Xu Z. (2008). Allelopathic effects of essential oil from *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* on pathogenic fungi and pest insects. <https://doi.org/10.1007/s11461-008-0036-5>
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Jeromel L., Vavpetič P., Pelicon P., Kaulich B., Gianoncelli A., Eichert D., Regvar M., in Kreft I. (2013). Spatially resolved distributions of the mineral elements in the grain of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Food Research International*, 54(1), 125–131. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.06.020>
- Szwed M., Wiczkowski W., Szawara-Nowak D., Obendorf R. L., in Horbowicz M. (2019). Allelopathic influence of common buckwheat root residues on selected weed species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(6), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S11738-019-2885-Y/FIGURES/3>
- Taralova E. H., Schlecht J., Barnard K., in Pryor B. M. (2011). Modelling and visualizing morphology in the fungus *Alternaria*. *Fungal Biology*, 115(11), 1163–1173. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2011.08.002>
- Vombergar B., Škrabanja V., Luthar Z., in Germ M. (2017). Izhodišča za raziskave učinkov flavonoidov, taninov in skupnih beljakovin v frakcijah zrn navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) / Starting points for the study of the effects of flavonoids, tannins ... *Folia Biologica et Geologica*, 58(2), 101. <https://doi.org/10.3986/FBG0031>
- Zhao J., Zhong L., Zou L., Zhang C., Peng L., Xiao W., in Zhao G. (2014). Efficient promotion of the sprout growth and rutin production of tartary buckwheat by associated fungal endophytes. *Cereal Research Communications*, 42(3), 401–412. <https://doi.org/10.1556/CRC.2013.0068>

Vpliv hladne plazme na kaljivost in dekontaminacijo semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)

Ravnjak Tim, Štepihar Denis, Tavčar Kunstič Tajda, Vukovič Alen

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

- Namen raziskave je bil preveriti vpliv hladne plazme (HP) na kaljivost in dekontaminacijo semen tatarske ajde. Semena tatarske ajde smo okužili s tremi različnimi vrstami gliv, pri čemer smo izbrali dve patogeni (*Alternaria alternata* in *Fusarium graminearum*) in eno endofitsko vrsto (*Epicoccum nigrum*).
- Semena smo pred eksperimentom površinsko sterilizirali, nato pa jih načrtno umetno okužili z izbranimi glivami. Okužena semena smo obdelali s HP, in sicer z različno dolgimi časovnimi izpostavitvami, nato pa vsak dan v tednu prešteli kaljivost semen ter po enem tednu ovrednotili kontaminacijo z izbranimi glivnimi vrstami.
- Ugotovili smo, da je dolgotrajnejša obdelava (45 s in 90 s) s HP vplivala na zakasnelost v kalitvi semen tatarske ajde in da je 180 s izpostavitve HP že smrtna doza za vsa semena v vzorcu. Dekontaminacija je bila deloma uspešna le pri glivi *Fusarium graminearum* (skoraj 90 % uspešnost dekontaminacije glede na kontrolno skupino).
- Potrdili smo hipotezo o vplivu daljše obdelave s HP na zakasnelost kalitve. Hipotezo, ki trdi, da bo ob daljši izpostavljenosti HP glivna kontaminacija semen tatarske ajde manjša, pa lahko potrdimo le za vrsto *Fusarium graminearum*.

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

Uvod

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) je kulturna rastlina, ki sodi v družino dresnovk (Polygonaceae), zaradi pomena v prehrani pa jo nekateri uvrščajo med "neprava žita". Kakor njena bolj znana sorodnica, navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench.), tudi tatarska ajda izvira iz vzhodne Azije, kjer poseljuje predvsem višje ležeče predele in uspešno raste tudi nad nadmorsko višino 2000 m. Danes je razširjena tudi po večinskem delu Evrope in Severne Amerike, običajno pa jo najdemo kot plevel med navadno ajdo. Za rod ajde je značilna odsotnost glutena, večja vsebnost nekaterih kovin (predvsem železa in cinka), pa tudi polifenolov, ki so za nas pomemben vir antioksidantov. Tatarska ajda vsebuje še posebej veliko koncentracijo polifenolov rutina in kvercetina (Fabjan in sod., 2003). Leta 2019 je letna svetovna produkcija ajde znašala 1,61 milijona ton (Tridge, 2021).

Ob večanju svetovnega prebivalstva, krčenju kmetijskih površin in vplivu podnebnih sprememb, se vedno znova poraja vprašanje, kako povečevati produkcijo kulturnih rastlin na obstoječih površinah. Velik vpliv na končno kmetijsko produkcijo ima kvaliteta semen in njihova odpornost na škodljivce in naravne toksine različnih izvorov. Še posebej škodljive so glivne okužbe, ki lahko povzročijo kontaminacijo na različnih stopnjah kmetijskega procesa – od okužbe na polju (field fungi) ali okužbe v skladišču (storage fungi) (Magan, 1985). Glive lahko izločajo sekundarne metabolite, kot na primer mikotoksine – ti so škodljivi za zdravje ljudi in živali, izločajo pa jih najrazličnejši rodovi gliv, kot so npr. *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, itd. (Bennet in Klich, 2003). Chittara in sod. (2004), so dokazali, da lahko glivne spore iz rodu *Penicillium* preko uporabe lastnih inhibitorjev in ob primernih okoljskih dejavnikih ostanejo viabilne več let, s čimer se težave v prehranski industriji le poglobljajo. Z uspešnim preprečevanjem glivnih kontaminacij na kulturnih rastlinah, bi lahko storili velik korak k reševanju svetovne problematike povezane s hrano in njeno dostopnostjo.

Osnovni načini zmanjševanja možnosti za okužbo z glivami so povezani z izbiro pravih kraja za gojenje rastline, kolobarjenja, pravilno obdelavo tal in dosledno in pravilno uporabo fungicidov (Shuping in Eloff, 2017). V zadnjem času je ena izmed obetavnih metod plazemska obdelava semen. Hladna plazma (HP) je četrto agregatno stanje – ioniziran plin (uporabimo lahko različne pline, kot so npr. kisik, dušik ali žlahtni plini). Ker za uporabo HP niso potrebne kemikalije, je ta metoda tudi bolj prijazna do okolja, kot na primer uporaba fungicidov ali drugih kemičnih agensov za zatiranje glivnih okužb. HP predstavlja potencialno učinkovito orodje za izboljšanje kaljivosti semen (ob blagem stresu se rast lahko izboljša) in za dekontaminacijo površinskih mikroorganizmov in njihovih sekundarnih metabolitov (Li in sod., 2014). Guo in sod. so leta 2017 dokazali, da je uporaba HP učinkovit način dekontaminacije pšenice in nekaterih drugih vrst, pri čemer se izboljša tudi njihova kaljivost in hitrost rasti.

V raziskavi nas je zanimalo, kako uspešna bo uporaba HP kot orodja dekontaminacije pri semenih tatarske ajde, umetno okuženih z različnimi rodovi gliv. Semena smo namreč umetno kontaminirali z dvema patogenima rodovoma gliv (*Fusarium* in *Alternaria*) in enim endofitskim rodom (*Epicoccum*), ki ima za razliko od patogenih vrst gliv na njo lahko celo številne pozitivne učinke (de Fávoro in sod., 2012). Preučili smo tudi vpliv obdelave s hladno plazmo na kaljivost semen.

Hipoteze:

- Ob daljši izpostavljenosti HP, bo glivna kontaminacija semen tatarske ajde manjša.
- Semena tatarske ajde, ki bodo dalj časa izpostavljena HP, bodo manj kaljiva.

Material in metode

Priprava poskusa

Na petrijevke z gojiščem PDA (potato dextrose agar) smo nacepili 3 izbrane vrste gliv, in sicer vrste *Alternaria alternata* (AA), *Fusarium gramineum* (FG) in *Epicoccum nigrum* (EN). To smo storili tako, da smo iz že prej pripravljenih plošč, kjer so bile glive že namnožene enotedenske kulture gliv, izrezali košček micelija (velikosti vsaj 0,5 cm x 0,5 cm) teh gliv in ga precepili na novo ploščo. Glive smo gojili na 2 % gojišču PDA z dodanim antibiotikom kloramfenikolom v koncentraciji 50 mg/L. Semena smo površinsko sterilizirali z namakanjem v 30% H₂O₂ in jih nato dali v eksikator. Nacepljene glive smo en teden gojili v rastni komori s konstantnimi pogoji (tema in temperatura 24 °C). Prej sterilizirana semena smo kasneje umetno kontaminirali z izbranimi glivami tako, da smo jih postavili na gojišča z glivnim micelijem in jih čez noč stresali na stresalniku.

Obdelava s hladno plazmo

Semena smo pobrali iz plošč in jih sterilno spravili v sterilne steklene posodice s pokrovom. Tako pripravljena semena smo razdelili v 4 skupine in jih obdelali s hladno plazmo v različnih intervalih: 45 s, 90 s in 180 s, ena skupina pa je ostala neobdelana (kontrolna semena). HP za obdelavo semen so generirali na Inštitutu Jožefa Stefana v Ljubljani, pri čemer je bil uporabljen induktivno sklopljen radiofrekvenčni napajalnik s frekvenco 27,12 MHz. Pri tem se je kot napajalni plin uporabil čisti kisik (99,99%), moč obdelave pa je bila 1 kW.

Kalitveni in glivni testi

Nastavili smo kalitvene in glivne poskuse. Za kalitvene teste smo uporabili 25 petrijevok, od tega pet za vsako skupino, tj. kontrolna semena, vakuumska kontrola, 45 s, 90 s in 180 s obdelave s HP. V vsako petrijevko smo dali dve plasti filter papirja in nanj položili 20 semen, obdelanih pod enakimi pogoji ter vse skupaj omočili. Semena smo kalili v temi, pod konstantnimi pogoji (22 °C, 60 % relativne zračne vlage). Za pripravo glivnih testov smo uporabili 65 petrijevok z gojišči PDA, od tega 20 za vsako vrsto glive (po pet za vsako skupino) in še dodatnih pet za površinsko sterilizirana semena (SS), ki so služila kot negativna kontrola uspešne sterilizacije petrijevok ob začetku poskusa. Na vsako gojišče smo dali po sedem semen, tako, da je bil med vsemi približno enak razmak. Vse petrijevke smo zatesnili s parafilmom. Tako pripravljene petrijevke z gojišči smo postavili v rastno komoro s prej omenjenimi pogoji. Vsak dan ob približno isti uri smo preverjali uspešnost kalitve. Zadnje ovrednotenje smo opravili teden dni po nastavitvi poskusa. Prešteli smo vsa vzkliša semena na kalitvenih testih in izračunali uspešnost kalitve. Pri glivnih testih pa smo prešteli vsa semena, na katerih je vidno prišlo do okužbe. Okužbe smo tudi ovrednotili, in sicer tako, da smo izmerili najdaljši premer okužbe in določili velikost okužene površine. Slednje smo določili z uporabo programske opreme ImageJ (Schindelin in

sod., 2012), pri čemer smo izračunali tudi delež gojišča, ki ga je prekrivala glivna kontaminacija.

Statistična analiza

Za statistično analizo smo uporabili programa Microsoft Excel in TIBCO Statistica. S pomočjo enosmerne analize variance (ANOVA) smo preverili ali se podatki statistično značilno razlikujejo s p-vrednostjo (p) 0,05 in intervalom zaupanja (1-p) 0,95. Nato smo preverili katere skupine se statistično značilno razlikujejo med seboj s pomočjo Tukey-evega post-hoc testa.

Rezultati

Kalitveni testi semen

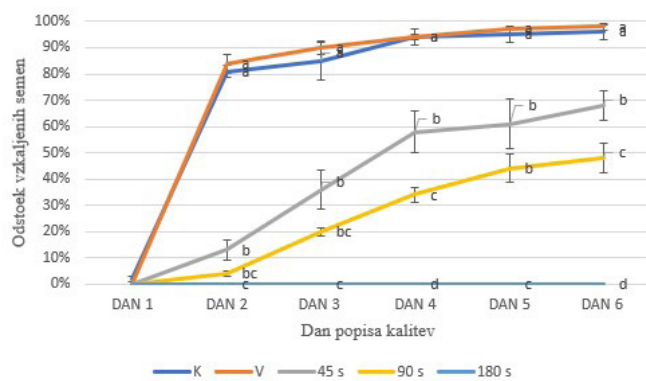
Po obdelavah semen s HP smo en teden vsak dan popisovali delež vzkaljenih semen tatarske ajde. Iz slike 1 lahko razberemo, da sta imeli največji delež vzkaljenih semen kontrolna (neobdelana s HP) skupina ter skupina semen iz vakuumske kontrole. S kalitvenimi testi smo dokazali, da ima dolžina obdelave s HP pomemben vpliv na kaljivost semen, tako da je kaljivost slabša pri daljših obravnava s HP. Po 45 s obdelavi je kalilo še približno 70 % vseh semen, medtem ko po 90 s obdelavi manj kot polovica v primerjavi s kontrolo. Ker pri najdaljši obdelavi s HP (180 s) semena sploh niso vzkalila, se meja dolžine obdelave s HP za preživetje semen ajde pri danih pogojih verjetno nahaja med 90 s in 180 s.

Dekontaminacija semen

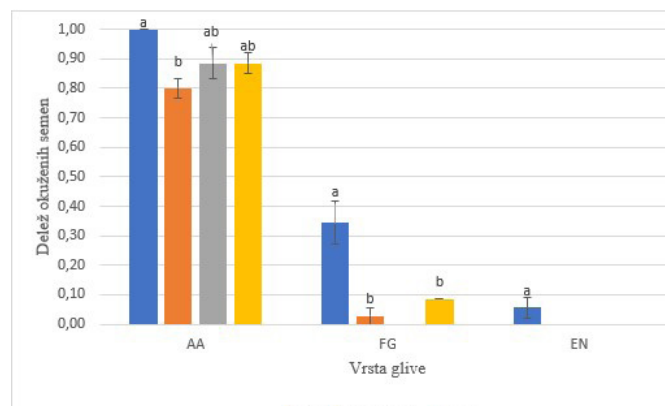
En teden po obravnavi semen s HP smo ovrednotili delež semen, pri katerih se je pojavila okužba z izbranimi glivami (AA, FG in EN). Kot lahko razberemo s slike 2, smo semena uspešno kontaminirali le z glivo AA, pri kateri tudi obdelava s HP ni imela večjega vpliva na znižanje kontaminacije, saj smo pri najdaljši obdelavi (180 s) dosegli le približno 10% manjšo kontaminacijo semen. Pri glivi AA smo najmanjši delež okuženih semen sicer zaznali po 45 s obravnavi. 45 s obravnava s HP se pri glivi AA tudi statistično značilno razlikuje od kontrole. FG je v kontrolni skupini okužila precej manjši delež semen kot AA (v povprečju le približno 35 % semen), se je pa za razliko od AA delež okuženih semen po obdelavi s HP precej zmanjšal (na manj kot 5 % po 45 s in manj kot 10 % po 180 s obdelavi). Najmanjši delež okuženih semen smo zaznali v skupini semen, okuženih z glivo EN, kjer kontaminacija semen ni bila uspešna, saj smo v povprečju kontaminirali le 5 % semen, tako da o učinkovitosti dekontaminacije s HP ne moremo govoriti.

Površine okužb semen

Poleg deleža kontaminiranih semen smo izmerili tudi površino petrijevke, ki jo je preraščala gliva. Preraščeno površino smo ovrednotili v odstotkih. Kakor pri deležu kontaminiranih semen lahko tudi iz rezultatov okuženih površin razberemo, da smo bili najmanj uspešni pri vrsti AA, saj obdelava s HP ni bistveno zmanjšala preraščenost glivne površine v primerjavi s kontrolno skupino. Glede na kontrolno vrednost je bila dekontaminacija FG s HP uspešnejša, saj se je delež okuženih semen po 45 s obdelavi s HP zmanjšal iz 0,3 na 0,09, po 180 s pa je znašal 0,14.



Slika 1: Rezultat testa kaljivosti semen tatarske ajde za posamezne dni, ovrednoten kot delež vzkaljenih semen pri posamezni obdelavi s HP. K – kontrola, V – vakuumska kontrola, 45 s - 45 sekundna obdelava s HP, 90 s - 90 sekundna obdelava s HP, 180 s – 180 sekundna obdelava s HP. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami (enosmerna ANOVA, Tukey-ev post-hoc test, $p < 0,05$).

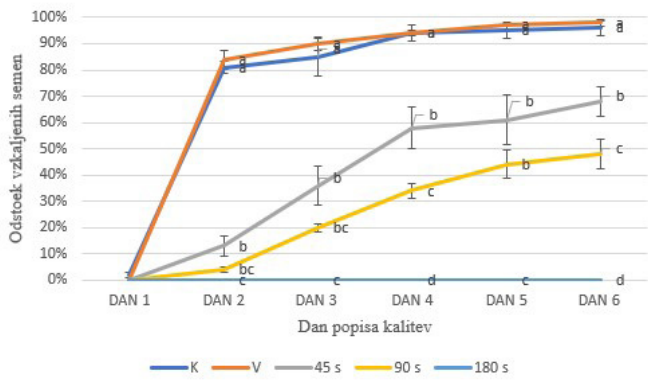


Slika 2: Delež okužbe semen tatarske ajde po obdelavi s HP (povprečje \pm SE; N = 5). Statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami označujejo črke nad posameznimi stolpci (enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test, $p < 0,05$). Označe: NO – neobdelana semena; 45 S – 45 sekundna obdelava s HP; 90 S – 90 sekundna obdelava s HP; 180 S – 180 sekundna obdelava s HP; AA – *Alternaria alternata*; FG – *Fusarium graminearum*; EN - *Epicoccum nigrum*.

Diskusija

Glivne okužbe semen kulturnih rastlin predstavljajo ob vedno večjih potrebah po hrani in izrazitemu povečevanju svetovnega prebivalstva (FAO, 2009) pomemben izziv raziskovalcev. HP se po dosedanjih študijah kaže kot potencialna rešitev, saj številni avtorji poročajo o pozitivnem vplivu na kalitev, dinamiko rasti in razvoja rastline ter tudi o dekontaminaciji semen. O slednji so denimo poročali Kordas in sod. (2015), kjer so na primeru pšenice (*Triticum aestivum*) dokazali zmanjšanje števila glivnih kolonij na semenih. Pozitivne učinke HP so med drugim dokazali že na navadni soji (*Glycine max*), kjer se je kaljivost semen po krajši izpostavitvi HP (15 s) izboljšala za do 63,33 % (Li in sod., 2014), pa tudi na ovsu (*Avena sativa*) (Šera in sod., 2010).

V našem poskusu smo opazili, da je obdelava s HP povzročila zmanjšanje in zamik kaljenja semen. Na grafu slike 1 lahko

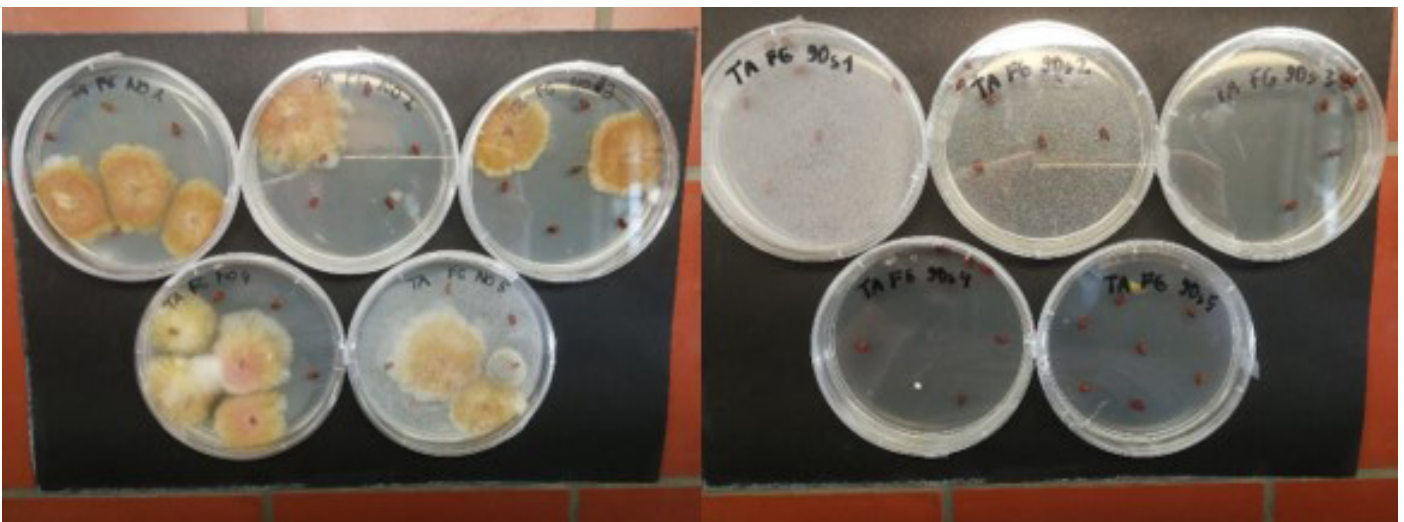


Slika 3: Odstotek površine petrijevke, ki so jo po obdelavi s HP prerastle glive AA, FG in EP (povprečje \pm SE; N = 5). Statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami označujejo črke nad posameznimi stolpci (enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test, $p < 0,05$). Oznake: NO– neobdelana semena; 45 S – 45 s obdelava s HP; 90 S – 90 sekundna obdelava s HP; 180 S – 180 sekundna obdelava s HP; AA – *Alternaria alternata*; FG – *Fusarium graminearum*; EN - *Epicoccum nigrum*.

opazimo, da se je delež vzkaljenih semen po 90 s obdelavi s HP glede na kontrolo zmanjšal približno za polovico, medtem ko se je ta delež pri 45 s obravnavi zmanjšal na približno 70 % kontrole. Časovni zamik v kalitvi semen so ugotovili tudi na pšenici, medtem ko vpliv obdelave s HP na semena ovsa (*Avena sativa*) ni bil opazen – vpliv se je izkazal šele pri rasti korenin (Šera in sod., 2010), česar pa v tej študiji na primeru tatarske ajde nismo preučevali. 180 s obravnava semen s HP se je izkazala kot premočna in pri tem vzorcu ni vzkalilo več nobeno seme tatarske ajde. Do enakih zaključkov so prišli tudi Mravlje in sod. (2021), le s to izjemo, da kalitev niso zaznali že pri 90 s obravnavi, vendar pa so v omenjeni študiji uporabili nekoliko močnejši vir za generacijo plazme (1,5 kW). Ker so v omenjeni študiji semena izpostavili HP tudi za čas 120 s, lahko domnevamo, da je to že skrajna meja za preživetje semen in da je 180 s izpostavitvev HP, ki smo jo opravili v našem eksperimentu, daleč nad smrtno dozo za preživetje semen. Pri neobdelanih (kontrolnih) in vakuumsko obdelanih semenih nismo zaznali večjih razlik, saj je pri obeh skupinah večina semen vzklila že med prvim in drugim dnev meritev, njun delež pa je bil tudi po koncu meritev zelo podoben.



Slika 4: Preraščenost površine petrijevok z glivo AA pri kontrolni skupini, torej s HP neobdelanih semenih (levo) in po 180 s obdelavi s HP (desno).



Slika 5: Preraščenost površine petrijevok z glivo FG pri kontrolni skupini, torej s HP neobdelanih semenih (levo) in po 90 s obdelavi s HP (desno).

Pomembnih razlik v kalitvi med neobdelanimi in vakuumsko obdelanimi semeni nismo zaznali, takšne rezultate pa navajajo tudi Mravlje in sod. (2021). Li in sod. (2014) so sicer na študiji uporabe HP na semenih navadne soje dokazali nekoliko izboljšano kaljivost, vendar so uporabili bistveno manjšo moč HP (80 W), medtem ko smo v naši študiji uporabili HP z 1 kW moči, razlike pa gre pripisati tudi pri različnosti semen tatarske ajde in navadne soje.

Glavni namen uporabe HP v tej študiji je bil preveriti njene fungicidne učinke, kar smo ovrednotili z deležem okuženih semen (slika 2) in deležem z glivo preraščene površine petrijevke (slika 3). Christensen je že leta 1957 kot najbolj pogoste taksone gliv, ki kontaminirajo semena navedel sledeče: *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* in *Rhizopus*, pri čemer pri skladiščenju semen pogosto dominirata rodova *Aspergillus* in *Penicillium*. V našem eksperimentu smo najbolj uspešno kontaminacijo semen tatarske ajde dosegli z vrsto AA, s to vrsto glive pa smo dosegli tudi največji delež kontaminirane površine petrijevke. Podobne rezultate kot v naši študiji so dobili tudi Kordas in sod. (2015), ki so, kot omenjeno, analizirali vpliv HP na dekontaminacijo semen pšenice, pri čemer so v dveh eksperimentalnih skupinah analizirali površinsko sterilizirana in nesterilizirana semena. V obeh primerih je največjo kontaminacijo povzročila gliva vrste AA, kar smo zaznali tudi v našem eksperimentu na primeru tatarske ajde. Pri kontaminaciji s to vrsto se je HP izkazala za neučinkovito metodo, vsaj pod našimi pogoji. Pri odstotku okužene površine tako ni prišlo do statistično značilnih razlik med posameznimi obdelavami s HP in kontrolo in 45 s obdelavo s HP zaznali pri deležu okuženih semen z glivo AA (slika 2). Ob upoštevanju rezultatov kalitvenega testa, kjer se je izkazalo, da semena tatarske ajde v manj kot polovici primerov preživijo obdelave s HP daljše od 90 s, pridemo do zaključka, da HP verjetno ni najbolj primerno sredstvo za dekontaminacijo ob okužbi z AA. Da so vrste gliv iz rodu *Alternaria* najbolj trdovratne ob poskusu dekontaminacije s HP, sta ugotovili tudi študiji Kordas in sod. (2015) in Mravlje in sod. (2021), pri katerih so analizirali vrstno sestavo gliv naravnega mikrobioma semen po obdelavi s HP. Pri obeh študijah so bile najbolj zastopane vrste pri analizah naravnega mikrobioma semen z po obdelavi s HP iz rodu *Alternaria*.

Precej drugače je pri okužbi s FG – pri slednji je bila že okuženost kontrolne skupine bistveno nižja kot pri AA (delež okuženih semen je bil nekaj več kot 30 %), obdelava s HP pa je povzročila skoraj nično rast glivnih kolonij (88,89 % učinkovitost dekontaminacije glede na kontrolno skupino). Tudi Nedyalkova in sod. (2019) poročajo o statistično značilnem zmanjšanju kontaminacije semen dveh sort pšenice s strani gliv iz rodu *Fusarium* po obdelavi s HP. Pri preračenosti petrijevk z glivo FG smo opazili tudi statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami s HP. Kordas in sod. (2015) navajajo kot najbolj optimalni čas obdelave s HP za dekontaminacijo semen 10 sekund, vendar je treba omeniti, da so v njihovi študiji uporabili bistveno močnejši vir HP, in sicer 8 kW (v naši študiji je bila uporabljena moč 1 kW). Pri vrsti FG smo v našem eksperimentu zaznali večjo uspešnost 90 s obdelave napram 180 s, vendar so v ozadju verjetno tudi napake med izvedbo. V študiji Mravlje in sod. (2021) se je izkazalo tudi, da je na tatarski ajdi več različnih vrst gliv kot na navadni ajdi in da so na teh dveh vrstah učinki HP na dekontaminacijo različni,

kar implicira na morebitno vrstno-specifično uporabo HP za namene dekontaminacije v prihodnosti. Podobno so ugotovili tudi v študiji Nedyalkova in sod. (2019), kjer so ugotovili, da imajo različni genotipi sort pšenice različne odzive na HP in da gre za aspekt, ki ga ob potencialni komercialni rabi ne smemo zanemariti. HP se je ob uporabi izkazal tudi v drastičnem zmanjšanju števila kolonij patogene glive *Rhizoctonia solani* na semenih križnic (Nishioka in sod., 2014).

Semena tatarske ajde smo okužili tudi z glivo EN, ki je tipičen endofit ajde in za razliko od AA in FG ni patogena. EN se je izkazala tudi kot najmanj "agresivno" vrsto, saj smo kontaminacijo z njo zaznali le v kontrolni skupini, pa še to le minimalno, zato o učinkovitosti dekontaminacije EN z uporabo HP težko govorimo.

Zaključek

Z eksperimentalnim delom smo preverili hipoteze o vplivu HP na dekontaminacijo semen in kaljivost semen tatarske ajde. Deloma lahko potrdimo prvo hipotezo, ki trdi, da se ob daljši izpostavljenosti HP glivna kontaminacija manjša. Naši rezultati se namreč razlikujejo glede na glivo, s katero smo okužili semena – ob okužbi z vrsto AA dekontaminacija s HP ni bila učinkovita, medtem ko smo pri vrsti FG v povprečju dosegli skoraj 90 % učinkovitost. Potrdimo pa lahko drugo hipotezo, ki trdi, da se kaljivost semen po daljši izpostavljenosti HP manjša.

Viri

- Bennett JW, Klich M, 2003. Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews* 16(3): 497–516.
- Chitarra GS, Abee T, Rombouts FM, Posthumus MA, Dijksterhuis J, 2004. Germination of *Penicillium paneum* Conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Applied and environmental microbiology* 70(5):2823–2829
- Christensen CM, 1957. Deterioration of stored grains by fungi. *The Botanical Review* 23:108–134
- de Fávoro LCL, de Sebastianes FLS, Araújo WL, 2012. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS ONE* 7,6:1–10
- 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 Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 22:6452–6455
- FAO UN, 2009. How to Feed the World in 2050. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf (13. dec 2021)
- Guo Q, Meng Y, Qu G, Wang T, Yang F, Liang D, Hu S, 2018. Improvement of wheat seed vitality by dielectric barrier discharge plasma treatment. *Bioelectromagnetics* 39: 120–131
- 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(1):433-438
- Li L, Jiang J, Li J, Shen M, He X, Shao H, Dong Y, 2014. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Scientific Reports* 4,1: 1–7
- Magan J, Lacey M, 1985. Interactions between field, and storage fungi on wheat grain. *Transactions of the British Mycological Society* 85:29-37
- Mravlje J, Regvar M, Starič P, Mozetič M, Vogel-Mikuš K, 2021. Cold Plasma Affects Germination and Fungal Community Structure of Buckwheat Seeds. *Plants* 10:851
- Nedyalkova S, Bozhanova V, Benova E, Marinova P, Tsonev I, Bogdanov T, Koleva M, 2019. Study on the Effect of Cold Plasma on

the Germination and Growth of Durum Wheat Seeds Contaminated
with *Fusarium Graminearum*. International Journal of Innovative

Approaches in Agricultural Research 3(4):623-635

Vpliv hladne plazme na kaljivost in dekontaminacijo semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench)

Bohar Zala, Cvetkovska Janina, Deurič Jana, Požun Nika

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

- Želeli smo ugotoviti, kako različno dolge obdelave semen s hladno plazmo vplivajo na kaljivost in površinsko dekontaminacijo umetno kontaminiranih semen navadne ajde.
- Semena ajde smo umetno okužili z glivami rodu *Epicoccum*, *Fusarium* in *Alternaria*, nato pa različno dolgo obdelali s hladno kisikovo plazmo (99,9 % kisik, 1000 W) - 45, 90 in 180 sekund. Tekom enega tedna smo opazovali kalitev pod kontroliranimi pogoji. Preverili smo še uspešnost dekontaminacije pri posamezni vrsti glive in statistično obdelali podatke.
- Ugotovili smo, da izpostavitve hladni plazmi negativno vpliva na kaljivost semen - najslabše so kaljiva po 180 sekundni obdelavi. Najmanj občutljiva na hladno plazmo je gliva *Alternaria alternata*. Pri glivnem testu semen okuženih z glivo *Epicoccum nigrum* nismo opazili rasti. Sklepamo lahko, da nismo uspešno izvedli kontaminacije.

Ključne besede: dekontaminacija, glive, hladna/nizkotemperaturna plazma, navadna ajda, semena

Uvod

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) je psevdo-žito, ki izvira iz osrednje Azije, vendar se že stoletja tradicionalno goji v srednji Evropi (Bonafaccia in Fabjan, 2003; Mravlje in sod., 2021a). Ajda je bogata z alkaloidi, flavonoidi, polifenoli, vitamini in minerali, ki se zaradi mnogih pozitivnih lastnosti pogosto uporablja v zdravstvene namene. Farmakološke študije so pokazale, da ima ajda antioksidativno, protivnetno, antigenotoksično, antidiabetično, antistresno in protirakavo delovanje. Je edina poljščina, ki vsebuje rutin, ta predstavlja 2-10 % suhe mase rastline. Zaradi odsotnosti glutena je primerna za bolnike s celiakijo. Poleg tega je tudi zelo medovita rastlina, saj praviloma cveti do prve zmrzali, zato se lahko medu kot stranskega produkta proizvede tudi do 300 kg/ha (Jacquemart in sod., 2012).

Semena poljščin pogosto kontaminirajo mikroorganizmi, predvsem glive, ki lahko semenski material okužijo že na polju ali tekom skladiščenja. Te lahko povzročijo bolezni rastlin, zmanjšujejo kakovost in hranilno vrednost zrn ter spremenijo njihov videz in vonj. Številne glive, kot na primer rodovi *Aspergillus*, *Alternaria* in *Fusarium*, pa lahko izločajo sekundarne metabolite – mikotoksine, ki so škodljivi za ljudi in živali. Kontaminirana semena tako niso uporabna za sejalne, prehranske ali krmne namene, kar se posledično odraža v ogromnih ekonomskih izgubah (Mravlje in sod., 2021a; Mravlje in sod., 2021b).

Trenutna naraščajoča uporaba pesticidov in drugih kemikalij škodljivo vpliva na zdravje in okolico (Ohta, 2016). Vse pogostejši problem predstavljajo rezistence mikroorganizmov, med njimi tudi patogenih gliv (Price in sod., 2015). Zaradi vsestranske uporabe ajde in strmo naraščajoče svetovne populacije, ter posledično potrebe za povečanje in izboljšanje kmetijske proizvodnje, se išče nove, ekološke in trajnostne pristope za dekontaminacijo semen (Mravlje in sod., 2021a; Mravlje in sod., 2021b). Ena izmed trajnostnih tehnologij je hladna plazma (HP), saj za njen nastanek ne potrebujemo velikega vložka energije in vode, prav tako pa njena uporaba ne ustvarja nobenih nevarnih ostankov v okolju. Pri obdelavi s HP material obdelujemo z nizko temperaturo in običajno kratkimi časi obdelave, s čimer ne povzročamo škode semenom, ljudem in okolici (Ohta, 2016; Misra in sod., 2016).

Plazmi pravimo četrto agregatno stanje. Je ioniziran plin, ki nastane z dovajanjem energije plinu. Vsebuje atome, molekule, radikale, pozitivno in negativno nabite ione, elektrone, UV fotone in vidno svetlobo. Delimo jo na visokotemperaturno in nizkotemperaturno plazmo ali HP, s temperaturo manjšo od 60° C, zato je primerna za biološke vzorce, kot na primer semena rastlin (Misra in sod., 2016). Dokazano je, da HP lahko vpliva na boljšo kaljivost semen, pospeši kalitev, poveča vsebnost nutrientov in metabolizem semen, ohrani kakovost semen, uniči mikroorganizme, kar omogoči površinsko dekontaminacijo semen ter degradira mikotoksine (Bourke in sod., 2018).

Namen raziskave je bil ugotoviti, kako različno dolge obdelave semen s HP vplivajo na kaljivost in površinsko dekontaminacijo umetno kontaminiranih semen navadne ajde. Semena so bila kontaminirana z glivami iz rodu *Alternaria* in *Fusarium*. Ti so glivični patogeni, ki povzročajo številne bolezni kmetijsko pomembnih rastlin (Mravlje in sod., 2021a). Del semen pa smo kontaminirali z glivami rodu *Epicoccum*, ki je endofit in pogosto kolonizira različne vrste žitnih semen (Kovačec in sod., 2016).

Hipoteze:

- Najslabšo kaljivost bodo imela semena, ki so bila najdlje izpostavljena HP.
- Ob daljši izpostavitvi semen HP se bo zmanjšala stopnja kontaminacije z glivami.
- Glive rodu *Epicoccum* bodo bolj odporne na obdelavo s HP, zato bo dekontaminacija v tem primeru manj uspešna.

Material in metode

Gojitev gliv ter kontaminacija semen

Za gojenje gliv smo najprej pripravili 2 % gojišče PDA (potato dextrose agar) z dodanim antibiotikom kloramfenikolom. 15g PDA smo dodali 700 mL destilirane vode ter 35 mg antibiotika. Končna koncentracija antibiotika v gojišču je tako znašala 50 mg/mL. Pripravljeno gojišče smo najprej avtoklavirali, prelili na plošče ter počakali, da se ohladi.

Izbrane vrste gliv *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum* in *Epicoccum nigrum* smo nato nacepili na gojišča PDA tako, da smo naredili po 3 paralelne ponovitve za vsako glivo. Petrijevke z glivami smo gojili 6 dni v rastni komori pod kontroliranimi pogoji (tema, 24 °C). Po 6 dneh je sledila kontaminacija semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*), ki smo jih predhodno površinsko sterilizirali s 30 % vodikovim peroksidom (H₂O₂). V vsako petrijevko z glivami posameznih vrst smo sterilno dali po 2 žlički semen. Petrijevke smo nato zaprli ter jih dali v stesalnik za 24 h. Naslednji dan smo semena sterilno pobrali iz gojišč ter jih dali v steklene čaše, ki smo jih sterilno zapakirali. V posamezni čaši so bila semena okužena z isto glivo.

Obdelava s hladno plazmo

Semena navadne ajde okužena s 3 vrstami gliv so na Inštitutu Jožef Štefana obdelali s hladno kisikovo plazmo. Gre za vakuumsko plazmo z radiofrekvenčnim virom napajanja. Kot plin so uporabili čisti kisik (99,99 %) pri moči 1000 W. Uporabili so 3 različne plazemske obdelave pri čemer so spreminjali čas izpostavitve semen: 45, 90 in 180 sekund. Po obdelavi so semena zapakirali v sterilne PVC vrečke, da so preprečili okoljsko kontaminacijo.

Kalitveni test

V 25 petrijevke smo položili po 2 plasti filter papirja, ter ga navlažili z destilirano vodo. Za vsako obdelavo (45, 90 in 180 sekund) smo naredili po 5 paralelnih ponovitev tako, da smo v vsako petrijevko razporedili po 20 semen. Hkrati smo pripravili kontrolo ter vakuumsko kontrolo po 5 paralelnih ponovitev s po 20 semeni. Semena smo gojili v rastni komori v temi pri kontroliranih pogojih (22 °C, 60 % vlažnost). Kalitveni test je potekal 7 dni, pri čemer smo vsak dan spremljali kalitev.

Glivni test

Za glivni test smo uporabili gojišča PDA (potato dextrose agar) z dodanim antibiotikom kloramfenikolom. V petrijevke smo razporedili po 7 semen navadne ajde tako, da smo za vsako obdelavo naredili po 5 paralelnih ponovitev. Hkrati smo naredili negativno kontrolo s površinsko steriliziranimi semeni ter pozitivno kontrolo z neobdelanimi semeni, ki so bila kontaminirana s tremi vrstami gliv. Tudi za posamezno

kontrolno smo v petrijevke dali po 7 semen, tako da smo naredili po 5 paralelnih ponovitev. Sledilo je gojenje gliv v rastni komori pri kontroliranih pogojih (24 °C, 60 % vlažnost). Po 7 dneh gojenja smo prešteli število kontaminiranih semen v posameznih petrijevkah ter izmerili premer micelija posameznih gliv.

Statistična analiza

S pomočjo programa Microsoft Excel smo izračunali povprečno vrednost in standardno napako (SE). Statistično razliko med posameznimi skupinami (obdelavami) smo določili s pomočjo programa Statistica Statsoft z uporabo enosmerne analize variance (ANOVA) z Duncan-ovim in Tuckey-ovim post hoc testom. V vseh primerih smo opredelili, da je statistično značilna razlika pri p-vrednosti < 0,05.

Rezultati

Kaljivost semen

Iz slike 1 lahko razberemo, da so najboljše kalila semena vakuumske kontrole ter semena kontrole, med katerimi po enem tednu ni bilo opaznih statističnih razlik. S podaljševanjem časa obdelave s HP kaljivost upada. Pri 45 sekundni obdelavi je po enem tednu skalilo 77%, medtem, ko je pri 90 sekundni izpostavljenosti skalilo manj semen kot pri 45 sekundni. Po enem tednu je pri 90 sekundni izpostavljenosti skalilo 50 % semen. Medtem ko so najslabše kalila semena, ki so bila izpostavljena obdelavi s HP najdlje, torej 180 sekund, kjer je po enem tednu skalilo le še 5 % semen.

Dekontaminacija semen

Po enem tednu smo določili tudi delež okužbe semen z glivami *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum* in *Epicoccum nigrum* po obdelavi s HP. Neobdelana semena (NO) so bila 100 % okužena z glivama *F. graminearum* in *A. alternata*, kar pomeni da je kontaminacija semen bila uspešna. Obdelava s HP je zmanjšala stopnjo okužbe z glivo *F. graminearum*, vendar pa razlike med posameznimi obdelavami s HP (45 sekund, 90 sekund in 180 sekund) niso statistično značilno različne, medtem ko se razlikujejo od neobdelanih semen.

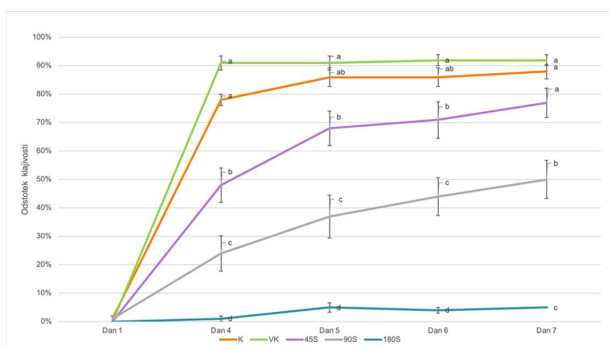
Okužba semen z glivo *A. alternata* je bila pri vseh obdelavah višja od 80 %. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik, kar pomeni, da s HP nismo uspeli dekontaminirati te vrste s semen. Na grafu ni podatkov za *Epicoccum nigrum*, saj je bila kontaminacija semen s to glivo neuspešna (Slika 2).

Površina glivnih kolonij

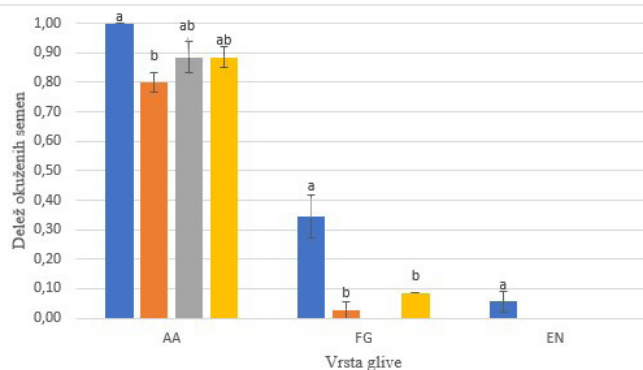
Površine glivnih kolonij smo prikazali kot delež preraščenosti petrijevke. Gliva *F. graminearum* je v povprečju prerasla več kot 50 % petrijevke pri neobdelanih semenih (NO). Obdelave s HP (45 sekundna, 90 sekundna in 180 sekundna) so bile učinkovite pri zaviranju rasti, saj je preraščenost v povprečju bila nižja od 10 % in se je statistično značilno razlikovala od skupine NO, na pa tudi med obdelavami. Glivne kolonije *A. alternata* so pri vseh obdelavah prerasle več kot 40 % petrijevke in se med seboj statistično značilno ne razlikujejo, prav tako ne od NO semen (Slika 3).

Diskusija

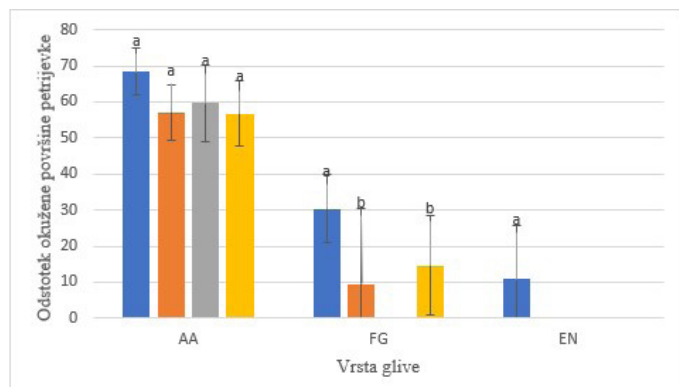
Številne študije so poročale, da z obdelavo semen s HP spodbudimo kalitev, izboljšamo dinamiko rasti ter zavremo rast patogenov (Randeniya in De Groot, 2015; Bormashenko in sod., 2012; Zahoranová in sod., 2016). V študiji Mravlje in sod., (2021a) pišejo, da predhodne študije niso pokazale pomembnih razlik med neobdelanimi kontrolnimi semeni in vakuumsko obdelanimi kontrolnimi semeni. Naši rezultati povsem sovpadajo z rezultati predhodnih študij, saj je po sedmem dnevu kaljivost semen pri neobdelanih kontrolnih semenih in vakuumsko obdelanih kontrolnih semenih povsem primerljiva. Na začetku opazovanja (do četrtega dneva) pa so vakuumsko obdelana kontrolna semena kalila malo hitreje in prej dosegla plato/maksimum, vendar razlike niso bile statistično značilno različne. Semena, ki so bila 45 sekund izpostavljena HP, so v povprečju kalila približno 10 % slabše kot kontrolna. Semena, ki so bila HP izpostavljena 180 sekund so kalila najslabše, saj jih je vzkliko le 5 %. V raziskavi Mravlje in sod. (2021a) so ugotovili, da po 90 sekundni izpostavitvi HP ta povzroči skoraj popolno zavrtje kalitve, medtem, ko je v naši raziskavi vzkliko 50% semen. Razlika v kalitvi je verjetno posledica slabše moči naše uporabljene vakuumske plazme, saj je bila v naši raziskavi uporabljena moč generatorja 1000W, v omenjeni raziskavi pa so uporabili 1500W generator. Statistično največje razlike med obdelavami so opazne v začetku kalitve, torej v prvih štirih dneh, kar sovпада s predhodnimi ugotovitvami (Mravlje in sod., 2021a) in nakazuje, da obdelava s HP povzroči zakasnitev pri kalitvi. HP se uporablja tudi za dekontaminacijo semen. Mravlje in sodelavci (2021a) so prišli do zaključka, da z daljšanjem obdelave semen s HP zmanjšamo prisotnost gliv, ki so naravno prisotne na semenih. V našem poskusu smo semena navadne ajde, ki smo jih predhodno površinsko sterilizirali, uspešno okužili z vrstama *A. alternata* in *F. graminearum*. Pri obdelanih semenih s HP, predhodno uspešno kontaminiranih z vrsto *F. graminearum*, je bila okužba prisotna pri manj kot 20 % semen. Iz rezultatov lahko sklepamo, da HP dobro zavre rast glive *F. graminearum*. Tudi v članku Mravlje in sod (2021b) poročajo, da so predstavniki rodu *Fusarium* zelo občutljivi na dekontaminacijo, saj so opazili popolno zaviranje rasti po 60 sekundni izpostavitvi HP. Nasprotno pa je gliva *A. alternata* verjetno bolj odporna na obdelavo s HP, saj je bilo tudi po obdelavi s HP več kot 90% semen še vedno kontaminiranih in nismo opazili statistično značilnih razlik med obdelanimi in neobdelanimi semeni. Težava je lahko v tem, da smo semena umetno okužili z veliko količino gliv, zaradi česar se je lahko ustvaril nekakšen biofilm. To bi lahko bil vzrok, da je bilo semena težje sterilizirati in so se glive ohranile na semenu kljub obdelavi s HP. Da je dekontaminacija s HP pri mikroorganizmih, ki so v biofilmih, manj učinkovita, je omenjeno predvsem pri bakterijah (Bourke in sod., 2017). To so pokazali Jahid in sod. (2014) s primerjavo učinkov HP na celice bakterije *Aeromonas hydrophila*, ki ne tvorijo biofilma in na tiste v biofilmu. Izkazalo se je, da za uničenje bakterijskih celic v biofilmu potrebujemo daljšo obdelavo. Struktura biofilmov je v splošnem bolj odporna na okoljski stres in na protimikrobna sredstva, saj ta težje dostopajo do samih celic (Bourke in sod., 2017). Obseg okužbe semen smo prikazali tudi z izračunom površine preraščenosti petrijevke posamezne vrste glive pri različno dolgih izpostavitvah. Dobljeni rezultati dobro sovpadajo z odstotkom okuženih semen. Največji delež preraščenosti



Slika 1: Slika prikazuje rezultate testa kaljivosti za 1., 4., 5., 6., in 7. dan. K-kontrola, VK-vakuumska kontrola, 45S-45 sekundna izpostavitvev plazmi, 90S-90 sekundna izpostavitvev plazmi, 180S-180 sekundna izpostavitvev plazmi. Z odstotkom kaljivosti je prikazano koliko semen je vzklilo pri posamezni obdelavi. Na sliki so označene tudi standardne napake (N=5). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami (enosmerna ANOVA, Duncanov post hoc test, $p < 0,05$).



Slika 2: Delež okužbe semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) po obdelavi s HP (povprečje \pm SE; N = 5). Črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami (enosmerna ANOVA, Tuckey-ev post hoc test, $p < 0,05$). Oznake: NO – neobdelana semena; 45S – 45 sekundna obdelava s HP; 90S – 90 sekundna obdelava s HP; 180S – 180 sekundna obdelava s HP; AA - *Alternaria alternata*; FG - *Fusarium graminearum*.



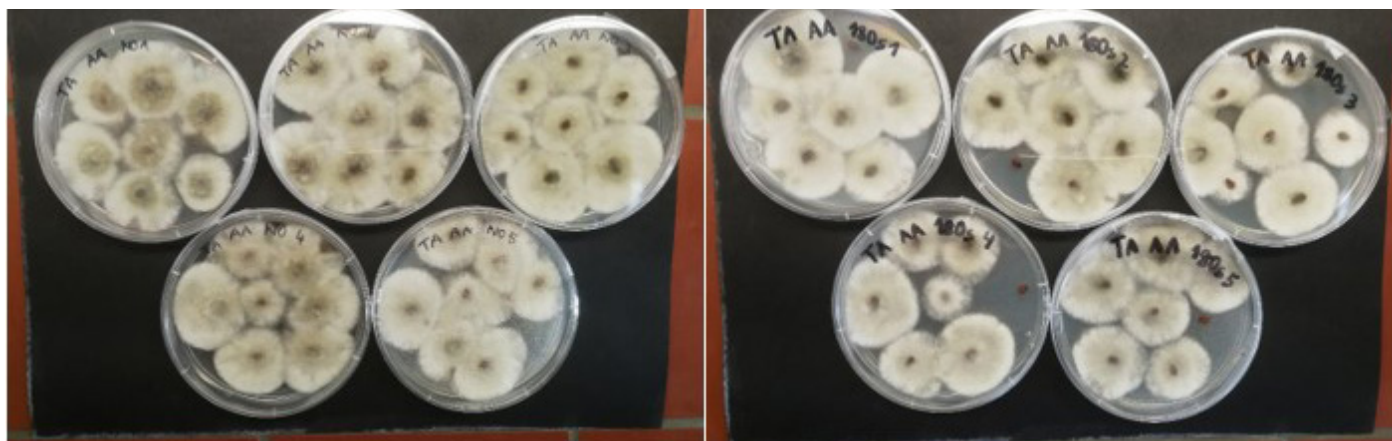
Slika 3: Delež preraščenosti petrijevke s kolonijama gliv *Alternaria alternata* (AA) in *Fusarium graminearum* (FG) po obdelavi s HP (povprečje \pm SE; N = 5). Črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami (enosmerna ANOVA, Tuckey-ev post hoc test, $p < 0,05$). Površina petrijevke znaša 6.264,80 mm². Oznake: NO – neobdelana semena; 45s – 45 sekundna obdelava s HP; 90s – 90 sekundna obdelava s HP; 180s – 180 sekundna obdelava s HP.

smo dobili pri neobdelanih kontrolnih semenih, saj je bilo pri tem vzorcu tudi največ okuženih semen, manjšo razrast glive pa smo izmerili pri obdelavi semen okuženih z glivo *F. graminearum*. Površina razrasti glive *A. alternata* se pri neobdelanih kontrolnih semenih in semenih obdelanih s HP ni značilno razlikovala.

Zaključki

- Najslabše so kalila semena po najdaljši, 180 sekundni, obdelavi s HP, kot smo predvideli, najboljše pa semena v kontroli in vakuumski kontroli.
- Nismo potrdili, da daljša obdelava s HP dekontaminira umetno okužena semena z izbranimi vrstami gliv. Potrdili smo le, da obdelava s HP delno zavre rast *F. graminearum*.
- Prav tako nismo potrdili, da so glive vrste *Epicoccum nigrum* manj občutljive na HP kot ostali dve, saj nismo opazili rasti gliv. Sklepamo, da v začetku ni bilo ustrezne kontaminacije semen.

Literatura



Slika 4. Petrijevke s semeni, kontaminiranimi z glivami *Fusarium graminearum* (FG) in *Alternaria alternata* (AA), pred in po obdelavi s HP. NO – neobdelana semena; 45S – 45 sekundna obdelava s HP; 90S – 90 sekundna obdelava s HP; 180S – 180 sekundna obdelava s HP.

1. Bonafaccia G, Fabjan N, 2003. Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet*, 81:349–355.
2. Bormashenko E., Grynyov R., Bormashenko Y., Drori E. 2012. Cold radiofrequency plasma treatment modifies wettability and germination speed of plant seeds. *Scientific Reports*, 2: 3–10
3. Bourke P, Ziuzina D, Boehm D, Cullen PJ, Keener K, 2018. The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production. *Trends in Biotechnology*, Volume 36, Issue 6:615–626.
4. Bourke P, Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Gilmore BF, 2017. Microbiological interactions with cold plasma. *Journal of Applied Microbiology*. 123: 308-324.
5. Filatova I, Azharonok V, Shik A, Antonuk A, Terletskaia N, 2012. Fungicidal Effects of Plasma and Radio-Wave Pre-treatments on Seeds of Grain Crops and Legumes. *NATO Sci. Peace Secur. Ser. A Chem. Biol.* 469-479.
6. Jacquemart AL, Cawoy V, Kinet JM., Ledent JF, 2012. Is Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Still a Valuable Crop Today? *European Journal of Plant Science and Biotechnology* 6:1-10.
7. Jahid IK, Han N, Ha SD, 2014. Inactivation kinetics of cold oxygen plasma depend on incubation conditions of *Aeromonas hydrophila* biofilm on lettuce. *Food Research International* 55: 181–189.
8. 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.
9. Misra NN, Schlüter O, Cullen PJ, 2020. Cold Plasma in Food and Agriculture. *Fundamentals and Applications*. Amsterdam, Elsevier: 368.
10. Mravlje J, Regvar, M, Starič P, Mozetič M, Vogel-Mikuš K, 2021. Cold Plasma Affects Germination and Fungal Community Structure of Buckwheat Seeds. *Plants* 2021a, 10:851.
11. Mravlje J, Regvar M, Vogel-Mikuš K, 2021. Development of Cold Plasma Technologies for Surface Decontamination of Seed Fungal Pathogens: Present Status and Perspectives. *Journal of Fungi* 2021b, 7:650.
12. Ohta T, 2016. Cold Plasma in Food and Agriculture. *Fundamentals and Applications*. V: *Plasma in Agriculture*. Misra NN, Schlüter O, Cullen PJ (eds.). Bia: 205-221.
13. Price CL, Parker JE, Warrilow A. GS, Kelly DE, Kelly S. L., 2015. Azole fungicides – understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Management Science*, 71, 8:1054-1058.
14. Randeniya LK, De Groot, GJJB, 2015. Non-thermal plasma treatment of agricultural seeds for stimulation of germination, removal of surface contamination and other benefits: A review. *Plasma Process. Polym.* 12:608–623.
15. Regvar M, Bukovnik U, Likar M, Kreft I, 2012. UV-B radiation affects flavonoids and fungal colonisation in *Fagopyrum esculentum* and *F. tataricum*. *Cent. Eur. J. Biol.*, 7:275–283.
16. 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.