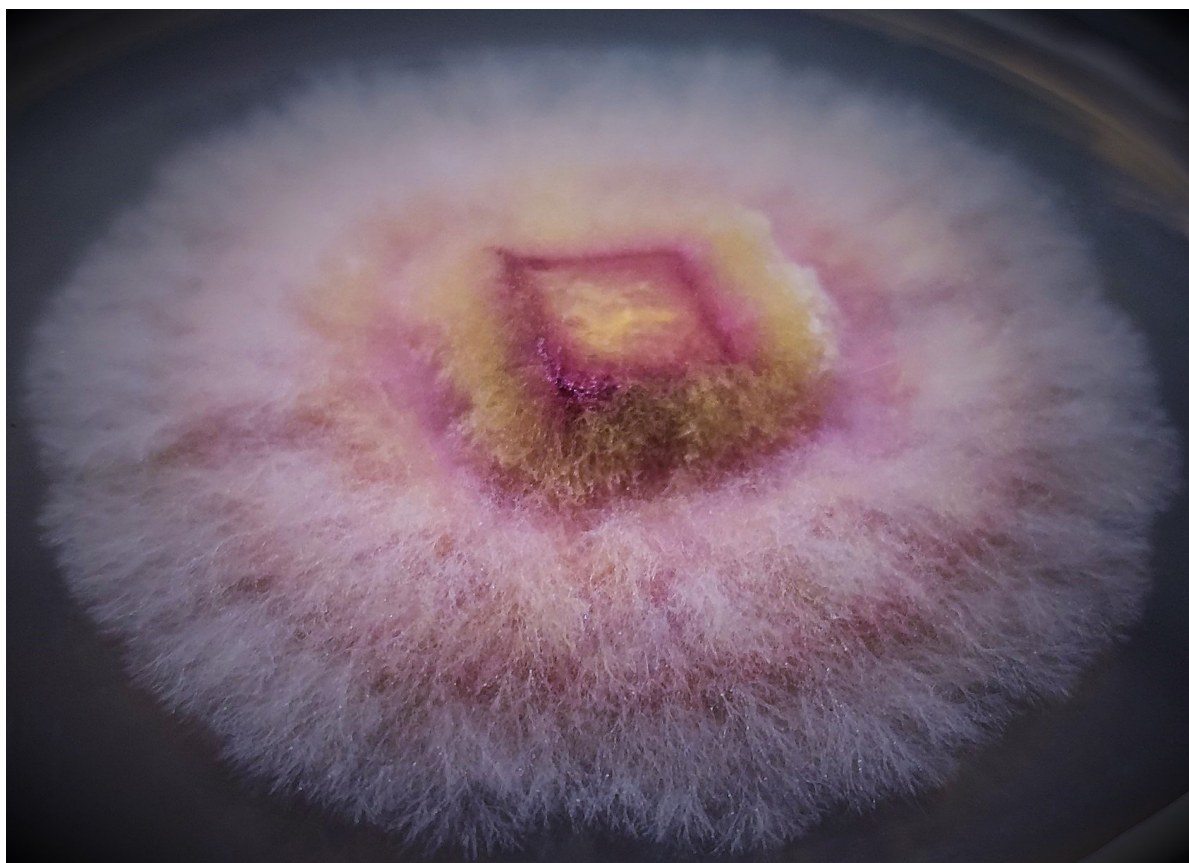


2022 Vol. 13 Št. 2

C S P P

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum



Zgodba iz naslovnice



Slika: Blaž Režonja

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>)

Raziskave so bile opravljene v okviru projektov J4-3091, J1-3014 in N1-0105 ter programa P1-0212, ki jih financira Slovenska agencija za raziskovalno dejavnost (ARRS).

4 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA MIKROBIOMA SEMEN NAVADNE AJDE (*FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH)

Neža Praček, Špela Saje, Lenart Žežlina, Anja
Habe

10 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA MIKROBIOMA SEMEN TATARSKE AJDE (*FAGOPYRUM TATARICUM* GAERTN.)

Hana Flajnik¹, Tanja Kobal², Katarina Pegan²,
Alenka Vesel²

15 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA MIKROBIOMA SEMEN PŠENICE *TRITICUM* 'GOROLKA'

Katarina Hrovat, Nika Paternost, Neža Škofljanc,
Nika Tivadar

19 VPLIV OBDELAVE SEMEN NAVADE AJDE Z ATMOSFERSKO SBD HLADNO PLINSKO PLAZMO NA KALITEV IN DEKONTAMINACIJO

Drejc Flajnik, Žak Glinšek, Žiga Nolde Drev, Ana
Rupar, Žiga Žibert

23 VPLIV OBDELAVE SEMEN NAVADE AJDE Z ATMOSFERSKO DBD HLADNO PLINSKO PLAZMO NA RAZKUŽEVANJE, KALITEV IN RAST KALIC

Miona Kovachevikj, Ana Kukenberger, Maja
Marinčič, Špela Rozman

28 VPLIV EKSTRAKTA ZRN TATARSKE AJDE NA KALITEV IN GLIVNI MIKROBIOM ZRNA KORUZE

Rok Bajc, David Belaj, Luka Malec, Jona Novljan,
Mirna Uran

33 VPLIV NAMAKANJA ZRN PROSA V CINKOVEM SULFATU NA BIOFORTIFIKACIJO RASTLIN S CINKOM

Kaja Adamek, Blaž Bajc, Nika Drnovšek, Zala
Kink, Špela Rupnik

38 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI EKSTRAKTOV PRAVE ALOJE (*ALOE* *VERA*) IN DREVESASTE ALOJE (*ALOE* *ARBORESCENS*) ZA ZAVIRANJE RASTI IZBRANIH VRST GLIV

Blaž Režonja¹, Maša Drevenšek²

43 ERRATUM - POPRAVEK ČLANKA IZ VOL. 13, ŠT. 1 BIOFORTIFIKACIJA KALIC SOJE S CINKOM

Katarina Hrovat, Nika Paternost, Neža Škofljanc,
Nika Tivadar

Izolacija in identifikacija mikrobioma semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench)

Neža Praček, Špela Saje, Lenart Žežlina, Anja Habe

Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

- Namen poskusa je bil preiskati mikrobiom semen navadne ajde, preveriti prisotnost endofitskih in celokupnih gliv na semenih ajde, jih izolirati in morfološko ter molekularno identificirati.
- Iz semen navadne ajde, iz treh različnih let (2018, 2019 in 2020), smo izolirali celokupne in endofitske glive tako, da smo jih prenesli na gojišča, po inkubaciji pa preverili prisotnost gliv zraslih iz semen. Glive smo razvrstili na podlagi morfolologije, jih precepili do čistih kultur, izolirali DNA in jih molekularno identificirali.
- Prisotnost celokupnih gliv je bila višja pri mlajših semenih, pri endofitskih glivah pa je bilo ravno obratno. Prevladujoči rodovi izoliranih gliv so bili *Epicoccum*, *Alternaria* in *Didymella*.
- Pestrost gliv na semenih navadne ajde je dokaj velika, med izoliranimi glivami pa so bili tudi rastlinski patogeni.

Ključne besede: endofitske glive, celokupne glive, morfotipizacija, molekularna identifikacija

Uvod

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) je dvokaličnica. Spada v družino dresnovk in ne v družino žit, v katero jo zaradi njenih hranljivih lastnosti pogosto zmotno uvrščamo. Je brezglutensko živilo, polno kakovostnih beljakovin, ogljikovih hidratov in mineralov (Vombergar s sod. 2017). Poleg tega vsebuje precej bioaktivnih komponent, kot so flavonoidi in maščobne kisline (Huda s sod. 2021).

Ajda je relativno enostavna za vzgojo ter odporna na številne patogene (Vombergar s sod. 2017). Zaradi enostavne vzgoje in ugodnih prehranskih lastnosti, navadna ajda vse bolj pridobiva na pomenu (Cawoy s sod. 2009).

Zanimivo je, da več kot 50 % celotnega svetovnega dnevnega vnosa kalorij predstavljajo žitarice (Los s sod. 2020).

Problematično pa je dejstvo, da se tretjina hrane zavrže že po žetvi. Kar do 60 % žitaric se zavrže med shranjevanjem, predvsem zaradi prisotnosti mikroorganizmov ali insektov. Zmanjšanje izgub po žetvi bi omogočilo večjo dostopnost hrane, zmanjšalo pritisk na naravne vire, pripomoglo bi v boju proti lakoti in povečalo zaslužek kmetov (Kumar in Kalita 2017). Zelo problematične so okužbe pridelka z glivami, saj te ogrožajo varnost hrane, povzročajo ogromno ekonomsko škodo ter proizvajajo toksične sekundarne metabolite – mikotoksine (Mravlje s sod. 2021). Zato so raziskave glivnega mikrobioma semen zelo pomembne.

Mikrobiota vpliva na številne lastnosti rastlin, kot so akumulacija biomase, produkcija metabolitov, toleranca na sušo in čas cvetenja. Nekoč so bili prepričani, da so semena pasivni prenašalci mikroorganizmov in se mikroorganizmi nanje prenesejo iz okolice. Verjeli so, da so semena ter kalice rastlin sterilna. Danes vemo, da to ni res in da imajo semena in celotne rastline svoj specifičen mikrobiom. Mikroorganizmi se lahko na rastline prenesejo s horizontalnim ali vertikalnim prenosom. Do horizontalnega prenosa pride iz okolja rastline, vertikalni prenos pa je direkten prenos s starša na potomca (Shade s sod. 2017).

Pri izvedenem poskusu nas je zanimal mikrobiom semen navadne ajde. Zanimale so nas glive, ki se nahajajo na površini semen in endofitske glive v semenu. Primerjali smo izolirane in identificirane glive med semeni različnih letin.

Materiali in metode

Izolacija celokupnih in endofitskih gliv iz semen ajde

Pridobili smo vzorce semen treh različnih letin, in sicer 2018, 2019 in 2020. Za vsako leto smo analizirali glivno združbo 20 celih (za izolacijo celokupnih gliv) in 40 razpolovljenih semen (za izolacijo endofitskih gliv). Semena za izolacijo celokupnih gliv smo posamično postavili na sredino gojišča PDA, ki smo ga predhodno pripravili, tako da smo zatehtali 15 g PDA, 35 g kloramfenikola in dolili 700 ml dH₂O. Za izolacijo endofitskih gliv smo semena najprej površinsko sterilizirali (20 min v 30 % H₂O₂). Sterilizirana semena smo osušili, jih v sterilnih pogojih prerezali na polovičke in prenesli na gojišče PDA. Na gojišča smo prenesli polovičke dveh različnih semen. Skupno smo torej pripravili 120 plošč s semeni, ki smo jih inkubirali v rastni komori pod stalnimi pogoji (16/8 h dnevno-nočna ritmika, temperatura 23/20 °C, v temi).

Morfotipizacija gliv

Plošče smo pregledovali enkrat tedensko in preverjali rast gliv. Glive smo glede na njihove morfološke lastnosti (kot npr. barva, tekstura in način rasti) razdelili v morfotipe. Po 3 primerke vsakega morfotipa (v kolikor je bilo to mogoče) smo precepili na nova gojišča PDA in jih inkubirali pod zgoraj opisanimi stalnimi pogoji, da smo dobili čiste kulture gliv. Vsak morfotip smo po enotedenski inkubaciji ponovno precepili na novo gojišče PDA, da smo dobili čisto kulturo glive.

Molekulska identifikacija gliv

Za namene molekulske identifikacije gliv smo 2 primerka posameznega morfotipa postrgali z gojišča in ju s tekočim dušikom strli v terilniku. Vzorec smo spravili v epico in ga do nadaljnje uporabe zamrznili. V naslednjem tednu smo iz vzorcev izolirali DNA s komercialnim kitom GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit. Izolacijo DNA smo izvedli po navodilih proizvajalca. S pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR) smo iz izolirane DNA pomnožili ITS regijo. Uspešnost izolacije in pomnoževanja smo preverili na gelski elektroforezi. Vzorce DNA smo poslali na sekvenciranje v podjetje Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska). Pridobljene sekvence nukleotidnih zaporedij smo s pomočjo orodja BLAST (algoritem Ameriškega nacionalnega centra za biotehnoško dokumentacijo) poiskali v podatkovnih zbirkah in določili, kateremu taksonu pripadajo. Izbrali smo najnižji takson, ki smo ga glede na pridobljene podatke lahko določili.

Rezultati

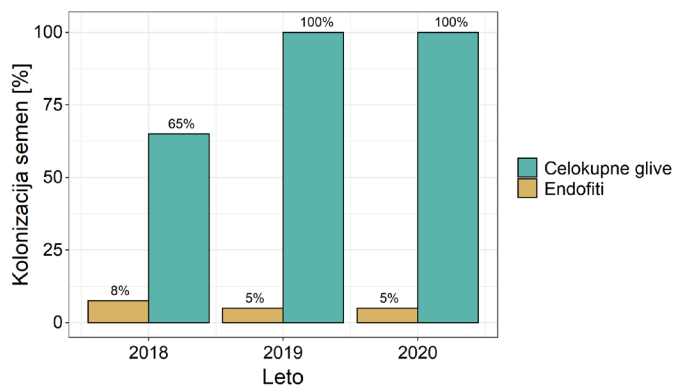
Glivna kolonizacija

Število prisotnih endofitskih in celokupnih gliv na semenih se razlikuje med leti. Prav tako se med seboj razlikuje število prisotnih endofitov (gliv, ki se nahajajo v tkivih semen) in celokupnih gliv. Te vključujejo tako endofitske kot epifitske (površinske) glive. Na semenih vseh treh letin je število celokupnih gliv večje kot število endofitskih gliv. Pri semenih iz leta 2018 je bil v primerjavi z letoma 2019 in 2020 prisoten nekoliko večji delež endofitov (Slika 1).

Morfotipizacija in molekulska identifikacija gliv

Glede na barvo, rob, obliko in površino glive, smo izolate razvrstili v 12 morfotipov (Slika 2), ki smo jih označili s črkami od A do L.

Za molekulsko identifikacijo smo izbrali po dva primerka izoliranih morfotipov. S pomočjo orodja BLAST smo glivam z opisanimi morfotipi določili ustrezen takson (Tabela 1). V tabeli (Tabela 1) so zbrane oznake in opisi morfotipov ter določeni taksoni. Nekatere morfotipe smo uspeli določiti do vrste natančno, nekatere le do rodu, nekaj pa jih nismo uspeli molekularno identificirati (E, G in J), smo jih pa določili na podlagi morfologije. V prilogi 1 so rezultati BLAST analize, po kateri smo posameznemu morfotipu določili takson. Pri celokupnih glivah smo opazili večjo morfološko pestrost v primerjavi z endofitskimi glivami. V semenih iz leta 2018 je največji delež celokupnih gliv (24 %) predstavljala gliva z morfotipom D, ki se je izkazala za vrsto *Papiliotrema laurentii*. Z 18 % ji je sledil morfotipom I - gliva iz razreda Agaricomycetes. V semenih iz leta 2019 so največji delež celokupnih gliv (skupno 56 %) predstavljali morfotipi B, C in H. Morfotip C, ki se je izkazal za vrsto *Alternaria alternata*, je predstavljal 22 %



Slika 1: Odstotek semen, ki so bila kolonizirana z endofitskimi in celokupnimi glivami po posameznih letinah. Za vsako letino smo testirali 40 semen za endofitske in 20 semen za celokupne glive.

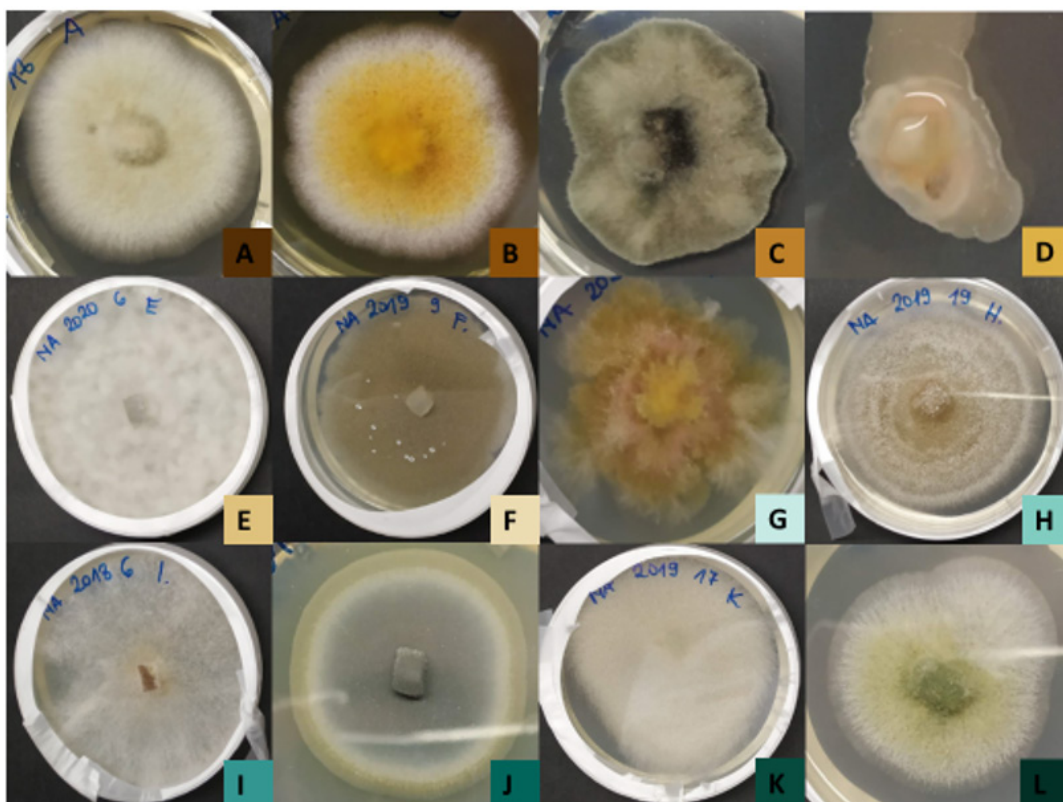
celokupnih gliv, morfotip H, ki se je izkazal za rod *Didymella*, je predstavljal 19 %, morfotip B, ki se je izkazal za rod *Epicoccum*, pa 15 % celokupnih gliv. V semenih iz leta 2020 so največji delež celokupnih gliv (skupno 76 %) predstavljali morfotipi A, B in C. Morfotipa A in B sta se izkazala za rod *Epicoccum*. Skupno sta predstavljala 56 % celokupnih gliv, morfotipu A, ki je predstavljal 20 % celokupnih gliv, smo uspeli pripisati tudi vrsto, in sicer *Epicoccum nigrum*. Morfotip C je predstavljal 20 % celokupnih gliv, izkazal se je za vrsto *Alternaria alternata*. V površinsko steriliziranih semenih smo izolirali manjše število gliv. Izmed štirideset semen sta bili iz leta 2020 kolonizirani le 2 semeni in sicer z morfotipom E, ki smo ga glede na morfologijo določili kot *Botrytis* sp. Prav tako sta bili med semeni iz leta 2019 kolonizirani le 2 semeni, in sicer z morfotipom I, ki se je izkazal za razred Agaricomycetes. Največ, in sicer 3 endofite, smo izolirali iz semen iz leta 2018, 2 sta pripadala morfotipu D

(kvasovka *Papiliotrema laurenti*) in eden morfotipu E (*Botrytis* sp.) (Slika 3).

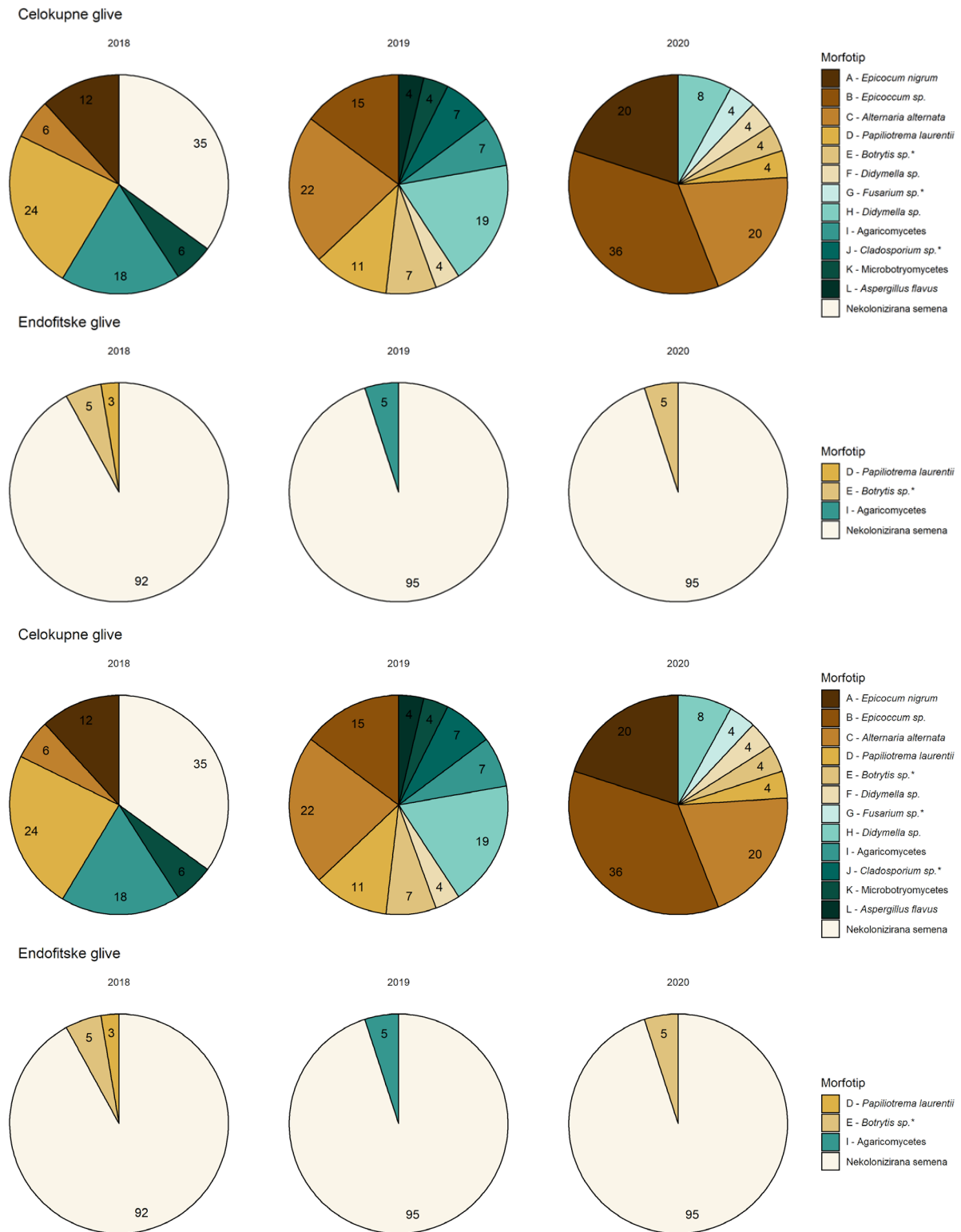
Diskusija

V številnih člankih omenjajo, da lahko semena ajde kolonizira 36 različnih glivnih vrst (Milevoj s sod. 1989, Kovačec s sod. 2016, Mills s sod. 1971). Glive, ki okužijo žita in psevdožita, izvirajo iz polj ali skladišč (Mravljje s sod. 2021). Vrste gliv in njihova pogostost se spreminjajo tekom skladiščenja (Kovačec s sod. 2016), kar je razvidno tudi iz naših rezultatov kolonizacije gliv s površine semen ajde. Deleži semen koloniziranih z endofiti so bili zelo nizki v primerjavi z deleži semen koloniziranih s celokupnimi glivami. Iz tega lahko sklepamo, da so semena večinsko kolonizirana z epifiti, endofiti pa predstavljajo le manjši delež pestrosti celokupnih gliv, ki kolonizirajo semena navadne ajde.

V naši raziskavi smo primerjali prisotnost endofitskih in celokupnih gliv pri semenih navadne ajde različnih letin. Pričakovali smo, da bomo pri starejših semenih iz leta 2018 identificirali manjše število gliv in manjšo diverzitetno morfološko raznolikost v primerjavi z mlajšimi semeni iz leta 2020, kar se je tudi izkazalo pri izoliranih celokupnih glivah. Pri endofitskih glivah pa smo iz semen iz let 2020 in 2019 izolirali manj gliv kot pri semenih iz leta 2018, kar sicer ni po pričakovanjih, vendar so bile razlike v številu izoliranih gliv minimalne (pri letu 2018 smo izolirali 3 glive, pri letih 2019 in 2020 pa po 2 glivi). Kovačec in sod. 2016 so namreč dokazali, da se s časom skladiščenja manjša število endofitov. V njihovem primeru se je tako pri navadni kot pri tatarski ajdi frekvenca koloniziranih semen z endofiti zmanjševala s časom skladiščenja. Da bi ugotovili zakaj smo dobili nekoliko drugačne rezultate, bi morali ponoviti poskus na večjem številu semen ter preveriti morebitni vremenski vpliv na letino in čas inkubacije. Literatura, povezana z glivnimi združbami semen ajde je precej



Slika 2: Na slikah je prikazan tipičen izgled posameznega morfotipa izoliranih gliv.



Slika 3: Raznolikost prisotnih morfotipov celokupnih (zgoraj) in endofitskih gliv (spodaj) pri semenih navadne ajde iz leta 2018, 2019 in 2020. Barve predstavljajo različne morfotipe, ki smo jih označili s črkami. Ob črkah so zapisani morfotipom pripadajoči taksoni. Taksoni označeni z * so bili določeni na podlagi morfologije, ostali pa molekularno. Številke na grafih predstavljajo odstotek prisotnosti določenega morfotipa pri endofitskih oziroma celokupnih glivah pri posamezni letini.

omejena in zastarela. Najpogosteje poročajo o kolonizaciji semen z vrstami *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* in *Botrytis cinerea* (Milevoj s sod. 1989, Kovačec s sod. 2016, Mills s sod. 1971). Molekulska identifikacija izoliranih gliv semen navadne ajde, ki smo jo izvedli je pokazala prevladujoče rodove *Epicoccum*, *Alternaria*, *Didymella* in razred

Agaricomycetes, identificirali pa smo še glive *Aspergillus flavus*, *Papiliotrema laurentii* in Microbotryomycetes.

Zaradi neuspešne izolacije DNA ali problemov s PCR reakcijo pri morfotipih E, G in J nismo uspeli pridobiti sekvenc, zato nismo mogli molekularno identificirati morfotipov. Na podlagi morfologije pa lahko sklepamo, da morfotip G pripada glivi

Tabela 1: V tabeli so zapisane oznake morfotipov, njihovi opisi in pripadajoči taksoni. Pri morfotipu E, G in J nismo uspeli pridobiti sekvenc, zaradi neuspele izolacije DNA ali PCR-ja. Takson zato ni določen na podlagi molekularna analize, smo ga pa določili na podlagi morfologije. Taksoni določeni na podlagi morfologije so označeni z *.

Morfotip	Takson	Opis morfotipa
A	<i>Epicocum nigrum</i>	bela, puhasta, oranžno dno
B	<i>Epicocum sp.</i>	izrazitejše bele nitke, rdeče-oranžno dno, puhasta, bela, rumen do prozoren rob
C	<i>Alternaria alternata</i>	na sredi temno zelena (olivno zelena), okoli bela, puhasta
D	<i>Papiliotrema laurentii</i>	kvasovka, roza in bela, svetleča
E	<i>Botrytis sp.*</i>	bela, puhasta, belo tudi dno
F	<i>Didymella sp.</i>	siva, puhasta, kolobarjasta, krožna
G	<i>Fusarium sp.*</i>	puhasta, bela ob robu, na sredini oranžkasta
H	<i>Didymella sp.</i>	bela, puhasta, na sredini rahlo rožnata
I	Agaricomycetes	prosojno bela
J	<i>Cladosporium sp.*</i>	na vrhu zeleno-modra, rob je bel, rumeno dno
K	<i>Microbotryomycetes</i>	puhasta, visoka, belo-sivkasata
L	<i>Aspergillus flavus</i>	belo-zelenkasta

rodu *Fusarium*. Predstavniki rodu *Fusarium* so pomembni rastlinski patogeni, ki povzročajo različne bolezni, kot so gniloba krošenj in kraste na žitnih zrnih, občasno lahko povzročijo tudi okužbe pri živalih (Nucci in Anaissie 2007). Povzročajo tudi venenje oz. gnilobo mladih rastlin, ki se pojavi predvsem na mestih predhodnih mehanskih poškodb (Kovačec s sod. 2016). Ker je morfotip E pri endofitih letin 2020 in 2018 prisoten v tako velikem deležu, bi na podlagi morfološkega izgleda tega morfotipa in podatkov v študiji Kovačec s sod. 2016 lahko sklepali, da gre za glive iz rodu *Botrytis*. Med predstavniki rodu *Botrytis* prav tako najdemo rastlinske patogene (Elad s sod. 2007). Ti povzročajo nekroze, propad kalic ajde in kloroze, odgovorni so tudi za večje izgube pridelka (Kovačec s sod. 2016). Iz morfologije morfotipa J, pa lahko sklepamo, da gre za rod *Cladosporium*. Nekatere vrste tega rodu so rastlinski patogeni, npr. *Cladosporium fulvum*, so pa tudi znani kot običajni endofiti rastlin (Bensch s sod. 2012). Vrsta *Alternaria alternata* se je v našem poskusu pojavljala med glivami izoliranimi iz površine semena. Ta gliva spada med fitopatogene, običajno prisotne že med žetvijo (Mravljec s sod. 2021). Gliva *Alternaria alternata* se je na semenih iz leta 2020 pojavila v 20 %, na semenih letine 2019 v 22 % in semenih letine 2018 v 9 %. Ker je bila *A. alternata* napram ostalim vrstam zastopana v velikem odstotku, bi bilo to lahko problematično med skladiščenjem. Vrste rodu *Alternaria* so znane fitopatogene glive, ki povzročajo številne rastlinske bolezni, kot so črna pika nekaterih žitnih žit, črna gniloba paradiznika, črna in siva gniloba agrumov, okuži semena, stebila in liste ajde ter povzroča klorozo na listih (Milevoj s sod. 1989). Zelo pogoste so bile vrste rodu *Epicocum*, med katerimi je bila v največjem deležu zastopana vrsta *Epicocum nigrum*. Skupno je tako na semenih ajde iz leta 2020 kar 56 % gliv pripadalo rodu *Epicocum*, na semenih letine 2019 jih je bilo skupaj 15 % in 12% pri letini 2018. Vrsta *Epicocum nigrum* je saprofitska gliva, ki spada med Ascomycote ter je razširjena po vsem svetu. Kolonizira različne vrste tal in rastlin ter je

relativno neproblematičen oportunistični rastlinski patogen, katerega smo tudi v našem primeru izolirali iz površine semen ajde. Vrsta *E. nigrum* je povezana s primarnim rastlinskim razkrojem, hkrati pa je opisana kot rastlinski endofit s koristnim antagonističnim učinkom proti drugim mikroorganizmom (Fávaro s sod. 2011). Med izoliranimi površinskimi glivami se je pojavila tudi vrsta *Aspergillus flavus*, in sicer v 4% pri letini 2019. Vrsta *Aspergillus flavus* spada med glive, ki se razvijajo med skladiščenjem in vplivajo na kakovost semena tako, da zavirajo kalitev ali povzročijo kvarjenje shranjenega semena (Selcuk s sod. 2008). Kar nekaj izoliranih gliv (12% površinskih gliv v letu 2020 in 23% površinskih gliv v letu 2019) je pripadalo rodu *Didymella*. Glive iz tega rodu so fitopatogeni, ki okužujejo vse rastlinske organe (Ren s sod. 2019).

Zaključki

Semena poljščin namenjenih za prehrano vključno z ajdo, so velikokrat kontaminirana z mikroorganizmi, predvsem z glivami. To vpliva na zmanjšanje kakovosti, hranilne vrednosti in splošnega videza poljščin. Številne glive proizvajajo različne mikotoksine, ki ne samo škodujejo pridelku, temveč so nevarni tudi za ljudi. Zaviranje glivnih okužb semen z različnimi fungicidi ni ekološka rešitev, prav tako pa imajo le ti negativen vpliv na zdravje ljudi. V naši raziskavi smo potrdili, da je na semenih navadne ajde velika pestrost različnih taksonov gliv. Nekatere med njimi so tudi patogeni, na primer vrsta *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* ter glive iz rodu *Fusarium*, *Cladosporium*, *Botrytis* in *Didymella*. S staranjem semena se manjša delež koloniziranih semen. Ker raziskav na temo mikrobioma semen ni ravno veliko in ker mikrobiom pomembno vpliva na kakovost pridelka, je potrebno obsežnejše proučevanje kolonizacije semen navadne ajde pa tudi drugih žit in psevdžit tekom skladiščenja. Tako bomo lažje razumeli in preprečili glivne okužbe semen namenjenih tako za setev kot tudi za prehrano.

Literatura

1. Bensch K, Braun U, Groenewald J, Crous P, 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72:1–401.
2. Cawoy V, Ledent JF, Kinet JM, Jacquemart AL, 2009. Floral Biology of Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 3(1):1-9.
3. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, Dordrecht, Nizozemska.
4. Fávoro LCdL, de Melo FL, Aguilar-Vildoso CI, Araújo WL, 2011. Polyphasic Analysis of Intraspecific Diversity in *Epicoccum nigrum* Warrants Reclassification into Separate Species. *PLOS ONE* 6(8):14828.
5. Huda MN, Lu S, Jahan T, Ding M, Jha R., Zhang K, Zhang W, Georgiev MI, Park SU, Zhou M, 2021. Treasure from garden: Bioactive compounds of buckwheat. *Food Chemistry* 335:127653.
6. 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 Biol* 120(5):666-78.
7. Kumar D, Kalita P, 2017. Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries. *Foods* 6:1-22.
8. Los A, Ziuzina D, Boehm D, Bourke P, 2020. Effects of cold plasma on wheat grain microbiome and antimicrobial efficacy against challenge pathogens and their resistance. *International Journal of Food Microbiology* 335:108889.
9. Milevoj L, Kreft I, 1989. Buckwheat diseases. *Fagopyrum* (Buckwheat newsletter) 9:31–40.
10. Mills JT, Wallace HAH, 1971. Microflora of buckwheat seed, changes in storage and effect of seed treatments on seedling emergence. *Can. Plant Dis Surv* 51:154–158.
11. 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.
12. Nucci M, Anaissie E, 2007. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews* 20(4):695–704.
13. 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.
14. Selcuk M, Oksuz L, Basaran P, 2008. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology* 99(11):5104-5109.
15. Shade A, Jacques MA, Barret M, 2017. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology* 37:15–22.
16. Schneider EP, Dickert KJ, 1994. Health Costs and Benefits of Fungicide Use in Agriculture. *Journal of Agromedicine* 1(1):19–37.
17. Vombergar B, Skrabanja V, Luthar Z, 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.). *Folia biologica et geologica* 58(2):101-145.

Izolacija in identifikacija mikrobioma semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)

Hana Flajnik¹, Tanja Kobal², Katarina Pegan², Alenka Vesel²

¹Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

²Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Cilj poskusa je bil izolirati in identificirati tako celokupno glivno populacijo kot tudi endofitsko populacijo gliv, ki sta prisotni na oz. v semenih tatarske ajde. Izolirane glive smo morfološko okarakterizirali in molekularno identificirali, kar bi lahko pomagalo pri razvoju sredstev ali postopkov za zaščito skladiščenih semen tatarske ajde.
- Kot metodo izolacije gliv smo uporabili rast na gojišču PDA, za izolacijo endofitskih gliv pa tudi površinsko sterilizacijo semen ajde s H₂O₂.
- V eksperimentu smo uspeli iz semen izolirati epifite in tudi endofite. Največja številčnost celokupnih gliv je bila na semenih iz let 2020 ter 2018, medtem ko je bila pojavnost celokupnih gliv iz leta 2019 najmanjša. Ravno obratno smo največ endofitov izolirali iz semen, pobranih leta 2020. Najpogostejše izolirane glive so pripadale rodu *Alternaria* ter vrsti *Epicoccum nigrum*.
- V semenih tatarske ajde lahko najdemo tako epifite kot tudi endofite. Po številčnosti so prevladovali epifiti, saj preživetje endofitov s časom shranjevanja močno upada.

Ključne besede: glivni epifiti, glivni endofiti, morfološka karakterizacija gliv, skladiščenje semen

Uvod

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) je zaradi velike vsebnosti proteinov, esencialnih mineralov, vlaknin in flavonoidov ter njihovih pozitivnih učinkov na človeško zdravje pridobila na uporabi. Zaradi tega se je v zadnjem času proizvodnja te zdravilne dresnovke močno povečala (Kovačec s sod., 2016).

Rastline ne bivajo v sterilnem okolju, ampak so običajno v interakciji z drugimi organizmi, bodisi z makroskopskimi vretenčarji in nevretenčarji, bodisi z mikroorganizmi, ki vključujejo predvsem bakterije, glive in viruse. Epifiti so organizmi, ki poseljujejo predvsem površino rastline v stiku z zrakom ali zemljo, medtem ko so endofiti organizmi, ki v največji meri kolonizirajo notranjost rastline (Kumar s sod., 2017). Endofitne glive izločajo posebne encime, ki lahko vplivajo na razvoj embrija in kalic (Kovačec s sod., 2016). Glivni endofiti se vedno bolj uveljavljajo kot vir bioaktivnih metabolitov z značilnimi protibakterijskim, protiglivnim in protivirusnim delovanjem. Le-ti bi se v prihodnosti lahko uporabili v prehranske, medicinske ali kmetijske namene. V zadnjih letih je bilo odkritih mnogo novih spojin iz endofitov, kot so razni alkaloidi, terpenoidi, steroidi, lignini in fenoli z močnimi protimikrobnim delovanjem (Zhong s sod., 2017). Glivni endofiti in epifiti pa med drugim predstavljajo tudi velik problem pri shranjevanju semen. Glive, ki kolonizirajo seme, lahko sčasoma postanejo patogene ter naredijo seme neuporabno za shranjevanje in uporabo. Določene vrste gliv lahko vplivajo tudi na človeka, in sicer s sintezo mikotoksinov, ki imajo na človeka negativen vpliv (Kovačec s sod., 2016). V naši raziskavi smo se osredotočili na glivni mikrobiom semen tatarske ajde z namenom, da raziščemo prisotnost glivnih endofitov in tudi epifitov na različno starih skladiščenih semenih. Likar s sod. (2008) so pokazali, da tatarska ajda vzpostavlja odnose z mikoriznimi glivami v koreninskem sistemu. Prav tako so določili tudi nekatere glivne endofite. Glede na to predvidevamo, da (1) bodo semena vsebovala glivne epifite in/ali glivne endofite. Pričakujemo tudi (2) večjo pestrost in pojavnost glivnih epifitov v primerjavi z endofiti ter (3) večjo pestrost in pojavnost celokupnih gliv na mlajših semenih v primerjavi s starejšimi. Z morfološko in molekulsko karakterizacijo gliv bi lahko ugotovili, ali semena predstavljajo nevarnost za uživanje. Rezultati bi lahko doprinesli k razvoju novih sredstev ali postopkov za zaščito skladiščenih semen, ter tako izboljšali njihovo shranjevanje.

Materiali in metode

Priprava rastlinskega materiala in gojišč

Kot rastlinski material smo uporabili semena tatarske ajde, pobrana v letih 2018, 2019 in 2020. Delo je vključevalo izolacijo celokupnih gliv s semen ajde in izolacijo glivnih endofitov iz semen ajde. Za izolacijo celokupnih gliv smo uporabili 20 semen iz vsakega leta (skupaj 60 semen) in za izolacijo glivnih endofitov 40 semen iz vsakega leta (skupaj 120 semen). Za gojišča smo uporabili 2 % gojišča PDA (Biolife, 2021) z dodanim antibiotikom kloramfenikolom v koncentraciji 50 mg/L (Sigma Aldrich, 2021).

Izolacija celokupnih in endofitskih gliv

Za izolacijo celokupnih gliv s semen smo neobdelana semena položili na gojišča PDA, za izolacijo endofitov pa smo semena najprej površinsko sterilizirali (20 min v 30 % H₂O₂), jih prerezali na polovico in na eno gojišče položili po 2 polovici različnih semen. Sledila je 1-tedenska (za celokupne glive s površine oziroma epifite) oziroma 3-tedenska (za glivne endofite) inkubacija plošč v rastni komori v temi pri temperaturi 24 °C.

Morfološka karakterizacija gliv

Sledil je pregled plošč. Rast gliv je bila opazna samo pri ploščah z neobdelanimi semeni, medtem ko na ploščah s površinsko steriliziranimi semeni rast gliv praktično ni bila prisotna. Glive z neobdelanih semen smo morfotipizirali, tako da smo jih glede na videz (barva, oblika ipd.) in tip rasti razporedili v razrede od A do I. Po 3 primerke vsakega morfotipa smo precepili na sveža gojišča, s katerim smo ohranjali žive čiste kulture gliv. Pri ploščah s polovičkami semen smo zaznali rast potencialno endofitske glive le na eni plošči. Tudi to glivo smo precepili na sveže gojišče. Sledila je 1-tedenska inkubacija plošč v rastni komori v temi pri temperaturi 24 °C.

Naslednji teden smo čiste kulture gliv precepili na sveže gojišče, preostanek pa uporabili za molekulsko identifikacijo gliv. Glive (od vsakega morfotipa po 2 primerka) smo postrgali s plošč in jih strli v tekočem dušiku. Vzorci so bili shranjeni v zamrzovalniku na -20 °C do naslednjega tedna.

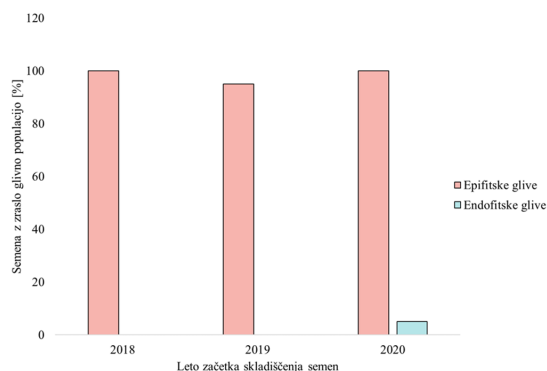
Molekulska identifikacija gliv

Za izolacijo DNA smo uporabili komplet GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich, 2021) in postopek izvedli po navodilih proizvajalca. Prvi korak priprave glivnega materiala v tekočem dušiku smo predhodno že izvedli (gl. Morfološka karakterizacija gliv). Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnožili ITS regijo na izolirani DNA (delno SSU (18S), ITS1, 5.8S, ITS2, delno LSU). Pogoje pomnoževanja smo povzeli po Likar in Regvar (2013).

Uspešnost izolirane in pomnožene DNA smo potrdili z gelsko elektroforezo na 1 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom pod UV transiluminatorjem. Uspešno pridobljene pomnožke smo nato poslali na sekvenciranje v podjetje MacroGen Inc. (Amsterdam, Nizozemska). Sekvence smo primerjali z že znanimi sekvencami v bazi NCBI s pomočjo orodja Nucleotide Blast. Morfotipe, za katere nam ni uspelo pridobiti ustreznih PCR pomnožkov ali najti podobnih sekvenc v obstoječi bazi, smo določili na osnovi morfologije, s pomočjo določevalnega ključa.

Statistična obdelava podatkov

Pridobljene podatke smo uredili v preglednici kot izhaja iz Priloge 1 in Priloge 2 (Seznam morfotipov gliv s fotografijami). Rezultate smo analizirali in grafično prikazali v programu Microsoft Excel z dodatkom XLSTAT Basic (Addinsoft). Za obdelavo podatkov smo uporabili analizo variance (ANOVA) po Duncanovem testu. Pri izračunu standardnih deviacij (SD) smo uporabili Excelovo funkcijo stdev.s, ki za izračun uporablja enačbo $\sqrt{(\sum(x_n - x)/(n - 1))}$, pri čemer je x vzorčna srednja vrednost (average $[x_1, x_2, \dots, x_n]$), n pa velikost vzorca.



Slika 1: Odstotek semen, pri katerih so po inkubaciji zrasli glivni epifiti/endofiti glede na leto začetka skladiščenja semen. N = 20 pri glivnih epifitih in N = 40 pri glivnih endofitih.

Rezultati

Kolonizacija semen z glivami

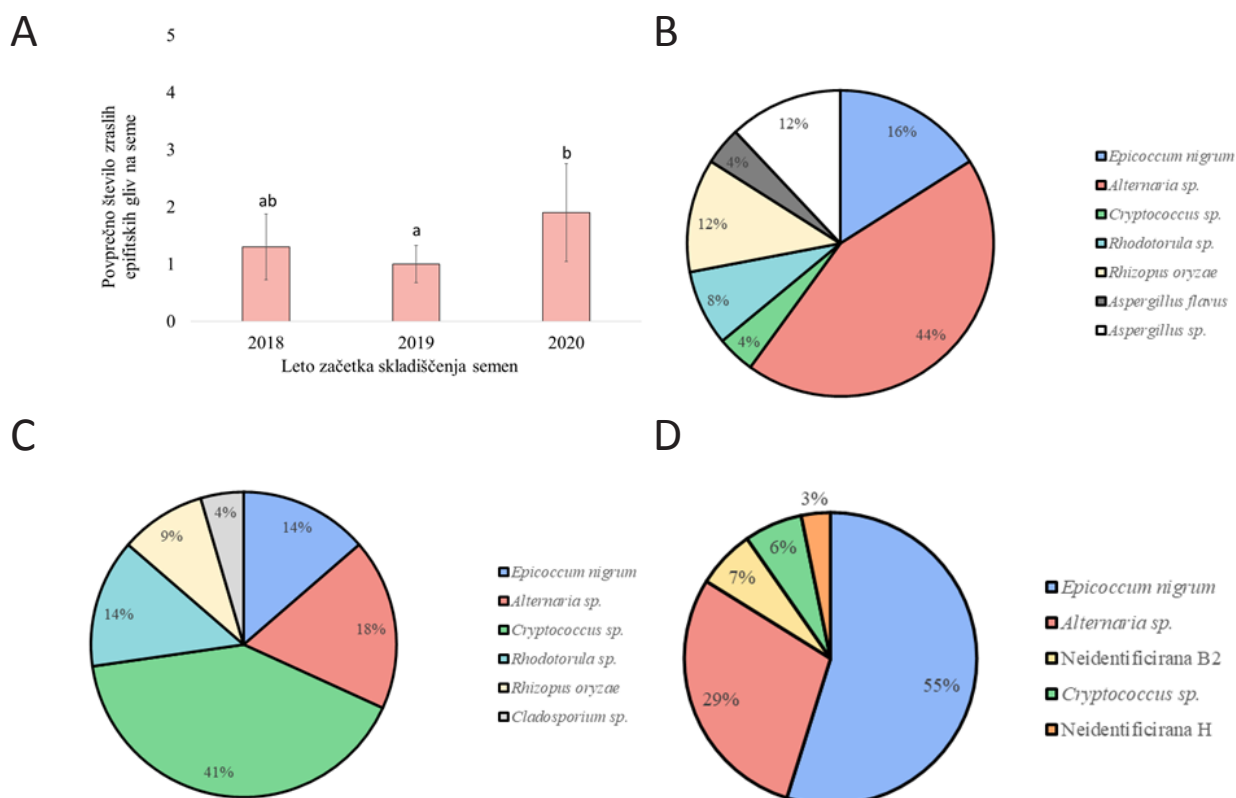
Po inkubaciji semen, ki jih predhodno nismo površinsko sterilizirali, smo pri skoraj vseh semenih iz vseh treh let opazili rast gliv (epifitov), kot je razvidno iz Slike 1. Pri semenih obdelanih s 30 % H₂O₂ smo rast gliv (endofitov) po inkubaciji opazili le na enem (1) semenu, ki je bilo skladiščeno od leta 2020, kar predstavlja 2,5 % vseh preiskovanih površinsko steriliziranih semen.

Pri semenih iz različnih let smo opazili razlike v številu zraslih glivnih epifitov na seme, kot je prikazano na Sliki 2A. Skupaj je s semen iz leta 2020 zraslo 38 glivnih epifitov, kar v povprečju predstavlja $1,9 \pm 0,85$ glivnih epifitov na preiskovano seme. S semen iz leta 2019 je skupaj zraslo 20 glivnih epifitov, kar v povprečju predstavlja $1 \pm 0,32$ glivnih epifitov na preiskovano seme. S semen iz leta 2018 je skupaj zraslo 26 glivnih epifitov, kar v povprečju predstavlja $1,3 \pm 0,57$ glivnih epifitov na preiskovano seme. Statistično značilna razlika v povprečnem številu zraslih kolonij na seme je bila tako le med letoma 2019 in 2020.

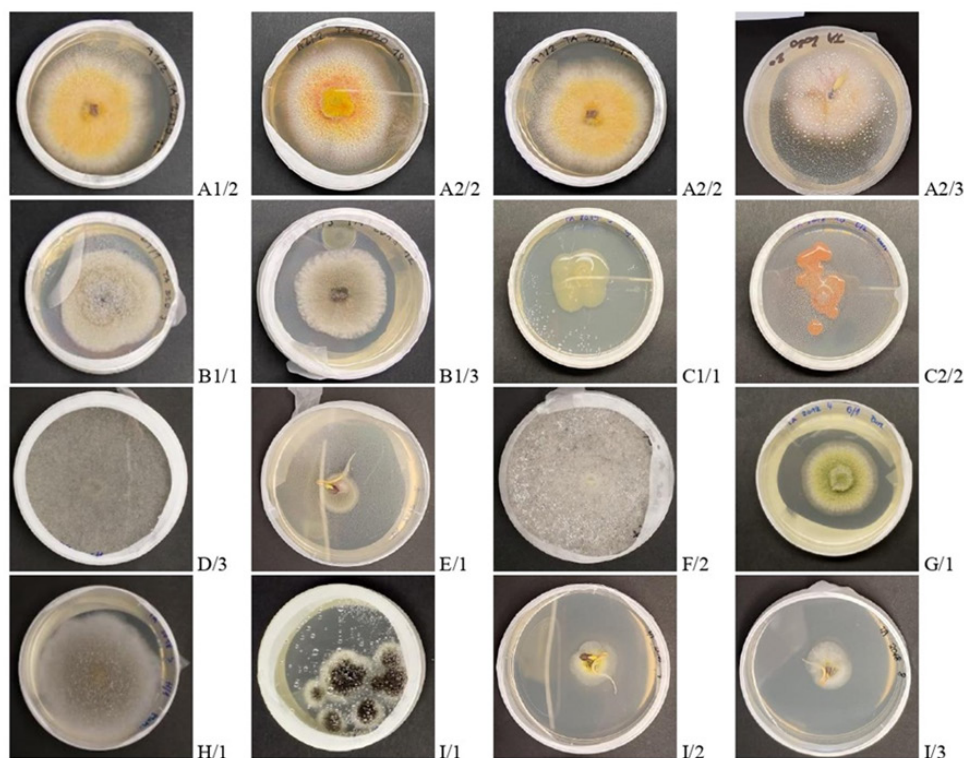
Diverziteteta in številčnost glivnih epifitov

Prepoznali in opisali smo 12 različnih glivnih morfotipov, kot izhaja iz preglednice v Prilogi 1 (Seznam glivnih morfotipov s fotografijami) in je prikazano na Sliki 3. Nekateri izmed njih (A, C2, D, E, F in G) smo identificirali z analizo PCR pomnožkov izoliranih sekvenc ITS regije. Za morfotipa D in F smo ugotovili, da predstavljata isto vrsto, tj. *Rhizopus oryzae*. Morfotipov B1, B2, C1, H in I nismo uspeli določiti na podlagi molekulske identifikacije. Morfotipe gliv B1, C1 in I smo določili na osnovi morfologije s pomočjo določevalnega ključa. Morfotipov B2 in H iz izbranimi metodami nismo mogli uvrstiti v nobeno od taksonomskih skupin.

Skupno smo izolirali 20 gliv. D: Prikazani so deleži posameznih taksonomskih enot izoliranih glivnih epifitov iz semen, skladiščenih od leta 2020. Skupno smo izolirali 38 gliv.



Slika 2: Diverziteteta in številčnost glivnih epifitov na semenih tatarske ajde. A: Prikazano je povprečno število zraslih glivnih epifitov na posamezno preiskovano seme glede na leto začetka skladiščenja ± SD. Različne črke (a, b) označujejo statistično značilno razliko (enosmerna ANOVA, Duncanov post hoc-test, $p < 0,05$). N = 20 semen. B: Prikazani so deleži posameznih taksonomskih skupin izoliranih glivnih epifitov iz semen, skladiščenih od leta 2018. Skupno smo izolirali 26 gliv. C: Prikazani so deleži posameznih taksonomskih skupin izoliranih glivnih epifitov iz semen, skladiščenih od leta 2019.



Slika 3: Izolirani morfotipi, ki smo jih poskušali določiti na podlagi molekularnih analiz. Morfotipov B1, B2, C1, H in I nismo uspeli določiti na podlagi molekularne identifikacije. Glive B1, C1 in I smo določili na osnovi morfologije s pomočjo določevalnega ključa. Morfotipov B2 in H z izbranimi metodami nismo mogli uvrstiti v nobeno od taksonomskih skupin.

Iz Slike 2B sta razvidna diverziteteta in delež posameznih morfotipov izoliranih glivnih epifitov iz semen, skladiščenih od leta 2018. Skupaj smo iz semen, skladiščenih od leta 2018, izolirali 26 gliv, ki so pripadle 7 različnim morfotipom. Številčno najbolj zastopan rod glivnih epifitov na semenih iz leta 2018 je bil vrsta *Alternaria*, ki je predstavljal 44 % vseh izoliranih gliv. Pogosto izolirani sto bili tudi vrsti *Epicoccum nigrum* (16 %), *Rhizopus oryzae* (12 %) in rod *Aspergillus*.

Iz Slike 2C sta razvidna diverziteteta in delež posameznih morfotipov izoliranih glivnih epifitov iz semen, skladiščenih od leta 2019. Skupaj smo iz semen, skladiščenih od leta 2019, izolirali 20 različnih gliv, ki so pripadle 6 različnim morfotipom. Številčno najbolj zastopan rod glivnih epifitov na semenih iz leta 2019 je bila vrsta *Cladosporium*, ki je predstavljal 41 % vseh izoliranih gliv. Pogosto izolirana sta bila tudi rodova *Alternaria* (18 %) in *Rhodotorula* ter vrsta *Epicoccum nigrum* (14 %).

Iz Slike 2D sta razvidna diverziteteta in delež posameznih morfotipov izoliranih glivnih epifitov iz semen, skladiščenih od leta 2020. Skupaj smo iz semen, skladiščenih od leta 2020, izolirali 38 gliv, ki so pripadle 5 različnim morfotipom. Številčno najbolj zastopana vrsta glivnih epifitov na semenih iz leta 2020 je bila vrsta *Epicoccum nigrum*, ki je predstavljala več kot polovico (55 %) vseh izoliranih gliv. Pogosto izoliran je bil tudi rod *Alternaria* (29 %).

Diskusija

Po inkubaciji semen na gojiščih PDA smo na ploščah zaznali rast epifitov. Največ epifitov smo zaznali na semenih iz let 2020 in 2018, kjer so s površine vseh 20 semen zrasli epifiti. Rezultat gojenja endofitov ni bil uspešen, saj smo uspeli

izolirati le enega endofita iz letine 2020. Možen razlog je, da živih endofitov v semenih res ni bilo več, morda pa bi več rezultatov dobili z uporabo drugačnega gojišča oziroma pogojev inkubacije plošč. Endofiti se lahko prenesejo z materinske na hčerinsko rastlino preko semena, lahko pa tudi preko vegetativnega razmnoževanja rastlin ali iz drugih rastlin, ki rastejo v bližini. Samo preživetje endofitov pa se tekom shranjevanja zelo zmanjša (Hill s sod., 2009; Hume s sod., 2013). Na preživetje vpliva veliko faktorjev, predvsem temperatura, vlažnost in čas shranjevanja (Hume s sod., 2013). Semena, pridobljena v letih 2019 in 2018, so bila v shrambi dlje, zato smo bili pri njihovem gojenju relativno neuspešni. A vseeno lahko potrdimo, da so naša semena vsebovala tako epifite kot tudi endofite. S tem je potrjena tudi hipoteza (1). Na ploščah, kjer smo gojili epifite in endofite, smo opazili znatno večjo pojavnost epifitov kot endofitov. Edinega pravega izoliranega glivnega endofita sicer nismo uspešno sekvencirali, a lahko na podlagi rezultatov, vidnih na ploščah, sklepamo, da sta pestrost in abundanca epifitov vsekakor večji kot endofitni pestrost in abundanca.

Hipoteze (3), v kateri smo trdili, da bomo na mlajših semenih našli večjo pestrost celokupnih gliv, nismo potrdili. V semenih, pridobljenih iz leta 2020, smo s sekvenciranjem zaznali le 5 različnih taksonov glivnih epifitov, medtem ko smo v semenih, ki so bila starejša (iz leta 2019 in 2018), zaznali kar 7 epifitnih taksonov. V starejših semenih se je na novo pojavila gliva *Rhizopus oryzae* in gliva iz rodu *Cladosporium*. Ker se vsebnosti antimikrobnih substanc, kot so flavonoidi, s shranjevanjem zmanjšujejo, glivni patogeni lažje kolonizirajo dolgo shranjena semena (Ghosh s sod., 2020; Hernandez-Perez in du Toit, 2006; Kibar in Kibar, 2019). Iz rezultatov sklepamo, da je tekom nepravilnega shranjevanja prišlo do neželenih kontaminacij

semen tatarske ajde. Glede na naše rezultate se pestrost epifitov s starostjo povečuje. Hipoteza (2), ki pravi, da bomo v semenih zaznali več epifitov kot endofitov, drži. Endofite smo uspeli izolirati le iz semen, pobranih leta 2020, in to le enega. Najpogosteje izolirana epifita sta bili gliva *Epicoccum nigrum* ter epifit rodu *Alternaria*. Tudi Mravlje s sod. (2021), Kovačec s sod. (2016) in Christensen (1957) poročajo o tem, da ajdo in druge žitarice poseljujejo najrazličnejše poljske glive. Naše ugotovitve se skladajo z izsledki podobnih študij, kjer so ugotovili, da glive iz rodov *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* in *Epicoccum* prevladujejo v mikrobiomu semen ajde (Mills s sod., 1971). *Epicoccum nigrum* je sicer običajen del semenskega mikrobioma in seme ščiti pred okužbami drugih mikroorganizmov (de Fávoro s sod., 2012). Delež izoliranega epifita *Epicoccum nigrum* se je z leti shranjevanja močno znižal. Do enakih rezultatov so prišli tudi Kovačec s sod. (2016), ki menijo, da do upada pride zaradi kratke življenjske dobe glivnih spor. Flavonoidi, inhibitorji proteinaz ter ostale antimikrobne snovi lahko vplivajo na življenjsko dobo spor (Kovačec s sod., 2016). Glive iz rodov *Alternaria*, *Rhizopus* in *Cladosporium*, ki smo jih poleg drugih izolirali tudi v našem poskusu, spadajo med fitopatogene glive, ki povzročajo preglavice predvsem v živilski industriji. Poljske glive lahko z izločanjem mikotoksinov naredijo semena ajde nevarna za človeka in druge živali ter znižajo njihovo kvaliteto (Christensen, 1957; Kovačec s sod., 2016). Vrste iz rodu *Alternaria* so pogosto povezane s težavami pri skladiščenju in transportu semen zaradi kvarjenja (Vučković s sod., 2012). Kovačec s sod. (2016) poročajo o škodljivem vplivu na kalitev in razvoj mladih rastlin, ki je povezan z ekstracelularno aktivnostjo encimov gliv, in sicer amilaz, celulaz in polifenol oksidaz.

Z boljšim poznavanjem mikrobioma semena tatarske ajde bi lahko v prihodnosti zmanjšali izgube zaradi kontaminacij in optimizirali obdelavo semen z namenom izboljšave njihovega shranjevanja. Zanimivo bi bilo podrobneje raziskati odnose med mikroorganizmi v mikrobiomu semen tatarske ajde (in tudi pri drugih kulturnih rastlinah), saj bi morda s pomočjo nepatogenih mikroorganizmov, ki zavirajo razrast patogenih mikroorganizmov (tako za rastlino kot tudi človeka), lahko kontrolirali pojavnost slednjih.

Zaključki

Preučevana semena tatarske ajde so vsebovala glivne epifite in tudi endofite. Med glivni epifiti smo zaznali večjo frekvenco in pestrost kot med izoliranimi glivnimi endofiti. To povezujemo predvsem s trendom preživetja endofitov, ki upada s časom shranjevanja semen. Med epifiti so bili najpogostejši predstavniki rodu *Alternaria* in vrsta *Epicoccum nigrum*. Na mlajših semenih (iz leta 2020) smo v nasprotju s predpostavko ugotovili manjšo pestrost celokupnih gliv kot na starejših semenih (iz let 2019 in 2018), četudi smo endofite izolirali le iz mlajših semen. Pridobljene rezultate bi lahko uporabili v

nadaljnjih raziskavah, s katerimi bi ovrednotili varnost semen za uživanje in raziskali načine za podaljšanje časa shranjevanja semen.

Literatura

- Christensen CM, 1957. Deterioration of stored grains by fungi. Bot. Rev. 23:69-83.
- 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.
- Ghosh T, Biswas MK, Aikat K, 2020. Determination of seed infectivity caused by rice (*Oryza sativa*) seed borne mycoflora. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology 20:1408-1419.
- Hernandez-Perez P, du Toit LJ, 2006. Seedborne *Cladosporium* variable and *Stemphylium botryosum* in Spinach. Plant Dis 90:137-145.
- Hill SN, Roach PK, 2009. Endophyte Survival during Seed Storage: Endophyte-Host Interactions and Heritability. Crop Sci 49:1425-1430.
- Hume DE, Card SD, Rolston MP, 2013. Effects of storage conditions on endophyte and seed viability in pasture grasses. Advances in seed science, technology and production. 405-408.
- Kibar H, Kibar B, 2019. Changes in some nutritional, bioactive and and morpho-physiological properties of common bean depending on cold storage and seed moisture contents. Journal of Stored Products Research 84: 101531.
- 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.
- Kumar J, Singh S, Ghosh P, Kumar A, 2017. Endophytic and Epiphytic Modes of Microbial Interactions and Benefits. Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: 227-253.
- Likar M, Bukovnik U, Kreft I, Chrungoo NK, Regvar M, 2008. Mycorrhizal status and diversity of fungal endophytes in roots of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and tartary buckwheat (*F. tataricum*). Mycorrhiza 18:309-315.
- Likar M, Regvar M, 2013. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. Plant Soil 370:593-604.
- Mills JT, Wallace HAH, 1971. Microflora of buckwheat seed, changes in storage and effect of seed treatments on seedling emergence. Canadian Plant Disease Survey, 51:154-158.
- 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.
- Vučković J, Bodroža-Solarov M, Vujić D, Bočarov-Stančić A, Bagi F, 2012. The protective effect of hulls on the occurrence of *Alternaria* mycotoxins in spelt wheat. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93:1996-2001
- Zhong L. Y., Zou L., Tang X.H. 2017. Community of endophytic fungi from the medicinal and edible plant *Fagopyrum tataricum* and their antimicrobial activity. Tropical journal of Pharmaceutical research. 16 (2): 387-396.

Izolacija in identifikacija mikrobioma semen pšenice *Triticum* 'Gorolka'

Katarina Hrovat, Nika Paternost, Neža Škofljanc, Nika Tivadar

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

- Namen raziskave je bila izolirati in identificirati glivni mikrobiom semen pšenice iz let 2017, 2019 in 2020, ter primerjava mikrobioma med posameznimi leti.
- Površinske glive smo izolirali iz 20 različnih semen iz posameznega leta, endofitske glive pa iz 40 različnih semen iz posameznega leta, tako da smo jih najprej vzgojili na gojišču iz 2% krompirjevega dekstroznega agarja, nato smo jih morfološko karakterizirali, precepili do čistih kultur ter iz njih izolirali DNA, da smo jih lahko molekulsko identificirali s pomočjo sekvenciranja glivnih ITS regij.
- Rezultati so pokazali razliko v številu prisotnih gliv na in v semenih iz različnih let, kot tudi razliko med prisotnimi epifskimi in endofitskimi glivami. Razlikovale so se tudi prevladujoče taksonomske skupine gliv, ki so bile prisotne pri semenih iz različnih let.
- Na mikrobiom pšenice vpliva več dejavnikov, med njimi tudi starost semen ter njihova potencialna kemična obdelava. Na semenih, ki so bila skladiščena manj časa je prisotnih več gliv, prav tako so prisotne druge skupine gliv, kot na tistih, ki so bila skladiščena več let.

Ključne besede: endofitske glive, površinske glive, rastlinski patogeni, skladiščenje žit

Uvod

Pšenica je ena najstarejših kulturnih rastlin na svetu in najpomembnejše žito današnjega časa. Za več kot tretjino svetovnega prebivalstva predstavlja eno izmed glavnih osnovnih živil, nepogrešljiva pa je tudi v prehrani živine (Shewry 2009; Battisti in Naylor 2009). Zaradi hitrega naraščanja svetovnega prebivalstva se povečuje tudi potreba po produkciji poljščin. Eden izmed vidikov, ki to lahko omogoči je boljše poznavanje rastlinskega mikrobioma (Morales Moreira s sod. 2020). Ta predstavlja številne mikroorganizme, vključujoč arheje, bakterije, protiste in glive, ki kolonizirajo organe rastlin (Shelake s sod. 2019). V kmetijskih sistemih poznavanje rastlinskega mikrobioma predstavlja možnost izboljšane in povečane produkcije rastlin. Mikroorganizmi ponujajo zaščito pred abiotičnim in biotičnim stresom, kot so klimatske spremembe, boljši privzem hranil ter zaščito pred škodljivci in patogeni (van der Heijden s sod. 2016; Rodriguez s sod. 2019; Singh s sod. 2019). V našem projektu smo se osredotočili na mikrobiom semen pšenice. Semena so eden najpomembnejših rastlinskih organov in predstavljajo svojevrsten mikrohabitat poseljen z različnimi mikroorganizmi. Semenski mikrobiom igra pomembno vlogo pri razvoju semen ter njihovi kalitvi, prav tako pa vpliva tudi na poznejšo strukturo in funkcijo celotnega mikrobioma rastline (Kužniar s sod. 2020; Nelson 2018). Mikroorganizmi, ki poseljujejo semena se delijo na endofite in epifite. Endofiti poseljujejo notranja tkiva (embrijo, endosperm) in se prenašajo večinoma z vertikalnim prenosom, epifiti pa se nahajajo na površini semen in se prenašajo s horizontalnim prenosom (Barret s sod. 2015). Najštevilčnejši predstavniki semenskega mikrobioma so bakterije in glive, na semena in poznejše stadije rastline pa imajo lahko tako pozitivne kot negativne oziroma škodljive učinke (Nelson 2018).

Namen naše raziskave je bilo izolirati in identificirati glivni mikrobiom semen pšenice iz treh različnih let (2017, 2019 in 2020). Zanimalo nas je katere vrste gliv bodo prisotne v in na semenih ter ali bomo zaznali razliko v glivni sestavi med različnimi leti. Zastavili smo si naslednje hipoteze: i) največ različnih skupin gliv bo prisotnih na semenih iz leta 2020, manj jih bo prisotnih na semenih iz leta 2019, najmanj pa na semenih iz leta 2017; ii) pri semenih iz vseh treh let bomo zaznali več površinskih gliv kot endofitskih gliv; iii) v notranjosti semen bodo prisotne druge vrste gliv kot na površini semen.

Materiali in metode

Uporabili smo semena pšenice sorte gorolka iz let 2017, 2019 in 2020. Semena iz leta 2017 so bila predhodno obdelana z neznano zaščitno plastjo rozaste barve. Za izolacijo površinskih gliv s semen pšenice smo vzeli po 20 semen iz vsakega leta ter položili eno seme na eno ploščo z gojiščem iz 2 % krompirjevega dekstroznega agarja (PDA) z dodanim antibiotikom kloramfenikol (50 mg l^{-1}). Za izolacijo endofitskih gliv pa smo semena najprej površinsko sterilizirali, tako da smo jih 20 minut namakali v 30 % vodikovem peroksidu (H_2O_2). Za tem smo 40 semen iz vsakega leta prerezali na polovico, ter na eno ploščo položili dve polovici različnih semen.

Tako pripravljena semena smo v rastnih komorah pri temperaturi $24 \text{ }^\circ\text{C}$ v temi, gojili en teden. Po enem tednu smo glede na barvo, obliko in razraslost morfološko karakterizirali površinske glive, površinsko sterilizirana semena za izolacijo

endofitskih gliv pa smo gojili še nadaljna dva tedna in nato identično izvedli morfološko karakterizacijo. Morfološko karakterizacijo smo izvedli tako, da smo skupaj 89 izoliranih gliv razvrstili v 13 razredov z oznakami A-S. Zrasle glive smo precepili na nova gojišča, ter jih gojili pri enakih pogojih kot prej, da smo dobili čiste kulture.

Nato smo 21 čistih kultur strli v tekočem dušiku in iz njih izolirali DNA s pomočjo kompleta GenElute® Plant Genomic DNA Miniprep Kit po navodilih proizvajalca. Izolacijo DNA smo uspešno izvedli pri 18 vzorcih, ki smo jih nato molekularno identificirali, tako da smo naredili verižno reakcijo s polimerazo (PCR) z uporabo ITS1-F in ITS4 začetnih oligonukleotidov, po protokolu Likar in Regvar, 2013. Da smo preverili ali je prišlo do uspešnega pomnožka glivne ITS regije, smo izvedli gelsko elektroforezo v 1 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom. Gele smo pogledali pod UV transiluminatorjem. Sekvenciranje dobljenih pomnožkov je bilo izvedeno v podjetju Macrogen Inc., Amsterdam, Nizozemska. Pridobljene sekvence smo analizirali s prosto dostopnim algoritmom NCBI BLAST®. Od skupaj 18 poslanih vzorcev, jih je 17 dalo uspešne in smiselne zadetke. Pri določevanju vrst gliv, iz katerih nismo uspeli izolirati DNA, smo upoštevali morfološko identifikacijo.

Rezultati

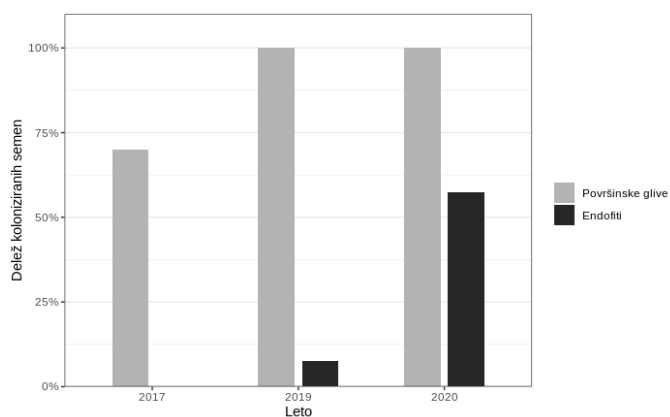
Delež koloniziranih semen

Skupaj smo iz semen iz leta 2017 izolirali 14 površinskih gliv in nič endofitov, iz semen iz leta 2019 smo izolirali 20 površinskih gliv in 3 endofite, iz semen iz leta 2020 pa 27 površinskih gliv in 25 endofitov.

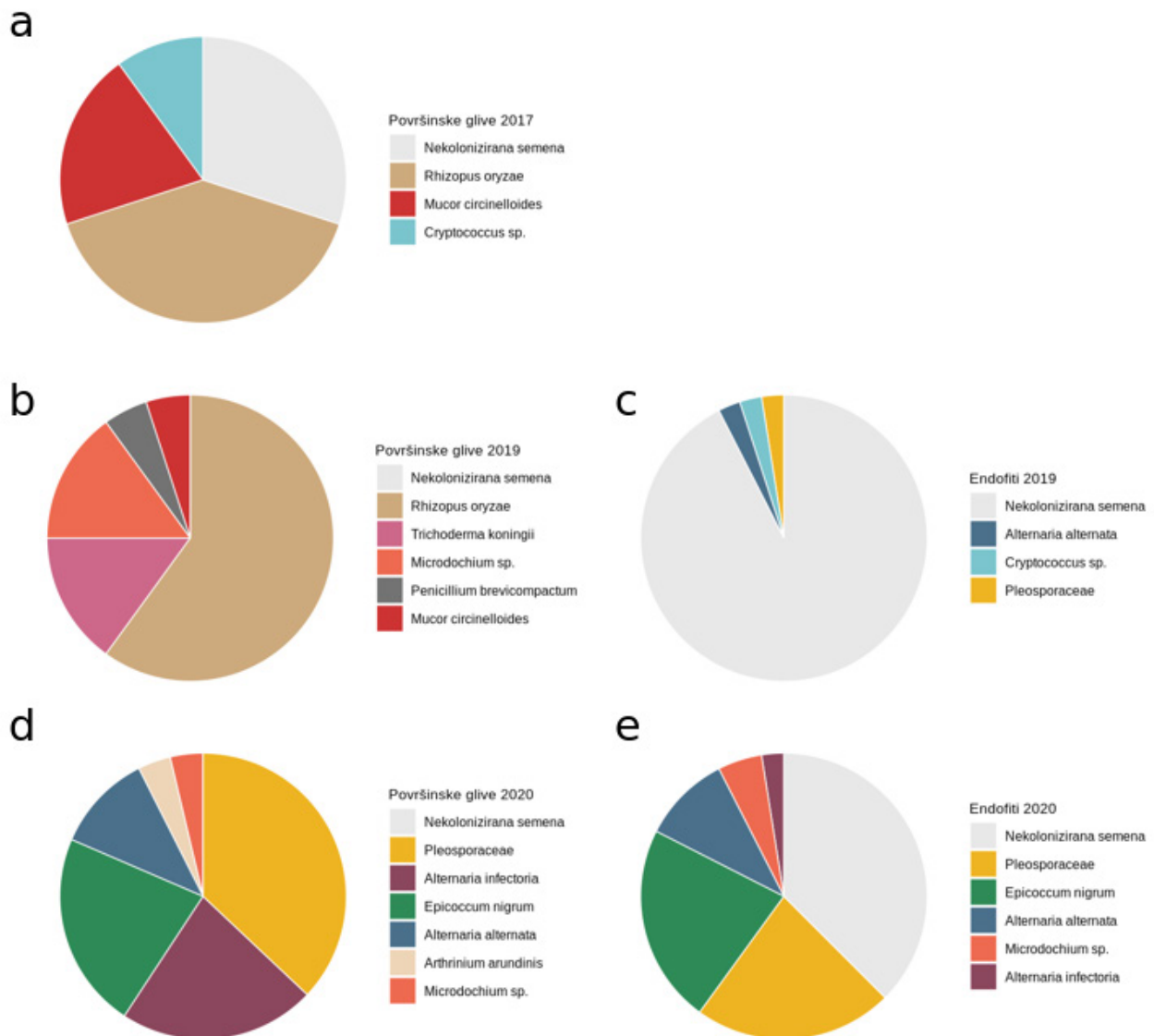
Pri preverjanju deleža semen, ki so bila kolonizirana z glivami, se je izkazalo, da je bilo 70 odstotkov semen iz leta 2017, ter vsa semena iz let 2019 in 2020 koloniziranih s površinskimi glivami. Z endofiti ni bilo kolonizirano nobeno seme iz leta 2017, 7,5 % semen iz leta 2019 ter 62,5 % semen iz leta 2020 (Slika 1). Tako smo opazili zmanjševanje števila celokupnih, predvsem pa endofitskih gliv s časom skladiščenja.

Glivna diverziteteta

Po pregledu rezultatov genetske analize vzorcev se je izkazalo, da so predstavniki petih morfotipskih razredov predstavljali



Slika 1: Delež semen iz posameznih let, ki so bila kolonizirana s površinskimi ($n=20$) in endofitskimi glivami ($n=40$).



Slika 2: Diverzitet gliv na površini in v notranjosti semen iz posameznih let. Grafi a, b in d prikazujejo glivno diverzitetu površinskih gliv na semenih iz leta 2017 (a), 2019 (b) in 2020 (d). Grafa c in e pa prikazujeta glivno diverzitetu endofitnih gliv iz semen iz leta 2019 (c) in 2020 (e).

ločene enotne vrste; to so bili razredi B – *Rhizopus oryzae*, C – *Penicillium brevicompactum*, I – *Cryptococcus sp.*, L – *Alternaria infectoria* in S – *Mucor circinelloides*. Morfolipski razred A je razpadel na dve ločeni vrsti – *Microdochium sp.* in *Trichoderma koningii*, prav tako je na dve ločeni vrsti razpadel morfolipski razred K – *Arthrinium arundinis* in *Microdochium sp.* Predstavnike razreda H pa smo zaradi razpada na različne vrste uvrstili v družino Pleosporaceae. Za morfolipska razreda M in G se je izkazalo, da sta predstavljata isto vrsto *Alternaria alternata*, morfolipski razredi J, O in P pa so vsi predstavljali vrsto *Epicoccum nigrum*. Razvrstitev v morfolipske razrede in rezultati genetske analize vzorcev so na voljo v Prilogi 1 in 2. Številčnost in diverzitet glivnih skupin se je razlikovala med različnimi leti. Najmanj različnih glivnih skupin je bilo prisotnih na semenih iz leta 2017, kjer je prevladovala prisotnost glivne vrste *Rhizopus oryzae*. Ista glivna vrsta je prevladovala tudi

na površini semen iz leta 2019. Največ različnih skupin smo odkrili na površini semen iz leta 2020, kjer so prevladovala glive iz družine Pleosporaceae ter vrsta *Epicoccum nigrum*. V notranjosti semen iz leta 2019 so bile prisotne glive iz dveh različnih skupin (rod *Alternaria* spada v družino Pleosporaceae). Med endofiti semen iz leta 2020 prav tako prevladujejo glive družine Pleosporaceae ter vrsta *Epicoccum nigrum*. Nobena skupina gliv se ni pojavljala zgolj med endofiti, bilo pa je nekaj takšnih, ki smo jih zaznali na površini gliv, v notranjosti pa ne – to so bile glive vrst *Rhizopus oryzae*, *Mucor circinelloides*, *Trichoderma koningii*, *Microdochium sp.* ter *Penicillium brevicompactum*. Vse ostale skupine so se pojavljale tako na površini kot tudi v notranjosti semen (Slika 2).

Diskusija

V raziskavi nas je najprej zanimala razlika v številu prisotnih gliv na površini in v notranjosti različno starih semen pšenice. Ugotovili smo, da je bilo pri najstarejših izmed proučevanih semen prisotnih najmanj gliv. To je lahko posledica višje starosti semen, ali pa tega, da so bila ta semena tretirana z neznanu kemično snovjo, ki je lahko povzročila sterilizacijo semen, prisotne glive pa so semena najbrž kolonizirale med skladiščenjem. Tudi sicer je številčnost in vrstna sestava prisotnih gliv odvisna od dejavnikov, kot so vremenske razmere, vlažnost, uporaba pesticidov ter aktivnosti različnih živali med samim zorenjem semen, njihovo žetvijo ter načinom skladiščenja (Doyle in Buchanan 2013).

Za tem nas je zanimalo še ali se pojavljajo razlike v vrstni sestavi gliv na semenih iz različnih let. Takšne razlike smo tudi odkrili. Glive, ki kolonizirajo semena se tradicionalno delijo v dva razreda; rastlinske patogene, ki kolonizirajo semena pred žetvijo, ter "skladiščne" glive, ki kolonizirajo semena po žetvi in med skladiščenjem (Miller 1995). Slednje glive so saprofitne, kar pojasni večinsko prisotnost vrste *Rhizopus oryzae* na površini semen iz let 2017 in 2019, medtem ko na semenih iz leta 2020, ki so bila skladiščena manj časa, ta vrsta ni bila prisotna. Enak vzorec pojavljanja je bil opažen tudi pri glivi vrste *Mucor*, ki prav tako velja za saprofitno. Ti dve vrsti sta bili edini izmed izoliranih gliv, ki se uvrščata v skupino Mucoromycota, medtem ko se vse ostale uvrščajo v skupino Ascomycota, z izjemo rodu *Cryptococcus*, ki spada v skupino Basidiomycota. Te ugotovitve se ujemajo z izsledki drugih raziskav, ki so pokazale, da večinski delež gliv, ki kolonizirajo semena pšenice, pripada družini Ascomycota (Solanki s sod. 2019, Solanki s sod. 2019).

Ugotovili smo tudi, da se večina gliv, ki smo jih izolirali iz naših semen, uvršča med patogene. Izmed izoliranih gliv se med pogosto omenjene patogene uvrščajo vrste rodov *Cryptococcus*, *Microdochium*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Alternaria* ter tudi drugi predstavniki družine Pleosporaceae (Błaszczuk in sod. 2021). Te vrste smo odkrili tako na površini kot tudi v notranjosti semen iz let 2019 in 2020, čeprav je bila njihova diverziteteta in številčna prisotnost višja v najmlajših semenih. Na semenih iz leta 2017 se je izmed naštetih patogenov pojavila zgolj vrsta *Cryptococcus*. Kot izjemo med večinsko patogenimi glivami, pa smo na površini nekaterih semen iz leta 2019 našli tudi predstavnika rodu *Trichoderma*. Za vrste, ki pripadajo temu rodu je namreč značilna simbiotska interakcija s pšenico, njihov pozitiven učinek na fitnes in donos pšenice, ter antagonistična aktivnost proti patogenom (Błaszczuk s sod. 2021).

Opazili smo tudi, da je bilo število endofitnih gliv najvišje v semenih iz leta 2020, nato pa je s starostjo semen prisotnost endofitov upadla, kar se sklada z ugotovitvami drugih raziskav, ki so pokazale upadanje števila endofitov s starostjo semen (Kovačec s sod. 2016). Izkazalo se je, da so bile vse skupine gliv, ki smo jih izolirali iz notranjosti semen, prisotne tudi na površini semen. To nakazuje na zmožnost, da bi lahko te skupine gliv potencialno živele tako endofitsko kot tudi epifitsko na semenih pšenice.

Zaključki

V naši raziskavi smo se osredotočili na izolacijo in identifikacijo glivnega mikrobioma semen pšenice iz treh različnih let. S

pridobljenimi rezultati smo uspeli potrditi dve izmed naših začetnih hipotez. Izkazalo se je, da je bila največja frekvenca in diverziteteta gliv prisotna na semenih iz leta 2020, malo manj jih je bilo na semenih iz leta 2019, najmanj pa na tistih iz leta 2017, kar nakazuje, da se stopnja kolonizacije s starostjo semen zmanjšuje. Prav tako smo potrdili, da semena poseljuje več površinskih gliv kot endofitskih. Hipoteza s katero smo predvidevali, da so v notranjosti semen prisotne druge skupine gliv kot na njihovi površini, pa se je v našem primeru izkazala za napačno.

Literatura

- Barret M, Briand M, Bonneau S, Prévieux A, Valière S, Bouchez O, Hunault G, Simoneau P, Jacques MA, 2015. Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* 81:1257-66.
- Battisti DS, Naylor RL, 2009. Historical Warnings of Future Food Insecurity with Unprecedented Seasonal Heat. *Science* 323:240-244.
- Błaszczuk L, Salamon S, Mikołajczak K, 2021. Fungi Inhabiting the Wheat Endosphere. *Pathogens* 10:1288.
- Doyle MP, Buchanan RL 2013. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Likar M, Regvar M, 2013. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant Soil* 370:593-604.
- 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.
- Kuźniar A, Włodarczyk K, Grządziel J, Woźniak M, Furtak K, Gałązka A, Dziadczyk E, Skórzyńska-Polit E, Wolińska A, 2020. New Insight into the Composition of Wheat Seed Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences* 21:4634.
- Morales Moreira ZP, Helgason BL, Germida JJ, 2020. Crop, genotype, and field environmental conditions shape bacterial and fungal seed epiphytic microbiomes. *Canadian Journal of Microbiology* 67:161-173.
- Miller JD 1995. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *J Stored Prod Res* 31:16.
- Nelson EB, 2018. The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant Soil* 422:7-34.
- Rodríguez PA, Rothballer M, Chowdhury SP, Nussbaumer T, Gutjahr C, Falter-Braun P, 2019. Systems Biology of Plant-Microbiome Interactions. *Molecular Plant* 12:804-821.
- Shelake RM, Pramanik D, Kim JY, 2019. Exploration of Plant-Microbe Interactions for Sustainable Agriculture in CRISPR Era. *Microorganisms* 7:269.
- Shewry PR, 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* 60:1537-1553.
- Singh D, Raina T., Kumar A, Singh J, Prasad R, 2019. Plant microbiome: a reservoir of novel genes and metabolites. *Plant Gene* 18:100177.
- Solanki MK, Abdelfattah A, Britzi M, Zakin V, Wisniewski M, Droby S, Sionov E, 2019. Shifts in the Composition of the Microbiota of Stored Wheat Grains in Response to Fumigation. *Frontiers in microbiology* 10:1098.
- Solanki MK, Abdelfattah A, Sadhasivam S, Zakin V, Wisniewski M, Droby S, Sionov E, 2021. Analysis of Stored Wheat Grain-Associated Microbiota Reveals Biocontrol Activity among Microorganisms against Mycotoxigenic Fungi *Journal of Fungi*. 7:781.
- van der Heijden MG, Hartmann M, 2016. Networking in the Plant Microbiome. *PLoS Biol* 14:e1002378.

Vpliv obdelave semen navade ajde z atmosfersko SBD hladno plinsko plazmo na kalitev in dekontaminacijo

Drejc Flajnik, Žak Glinšek, Žiga Nolde Drev, Ana Rupar, Žiga Žibert

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

- Z raziskavo smo želeli ugotoviti vpliv atmosferske hladne plazme (SBD) na potencialno patogene mikroorganizme, površinske glive, prisotne na površini semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*).
- Semena smo izpostavili atmosferski hladni plazmi (SBD) v treh različnih trajanjih, ter jih dali na gojišče PDA in analizirali prisotnost gliv, ki so zrasle.
- Glede na morfološke lastnosti smo določili 5 različnih glivnih rodov.
- Semena so po obdelavi s SBD plazmo kalila enako uspešno kot kontrola. Poganki in korenine so bile pri obdelanih semenih nekoliko daljše od neobdelanih, prav tako je bila masa le-teh posledično večja.
- Pričakovali bi, da z izpostavitvijo plazmi, semena do neke mere dekontaminiramo, kar bi pripomoglo k manjši uporabi sintetičnih fungicidov, a smo s testi potrdili, da niti najdaljša izpostavitvev ni zmanjšala glivne populacije na površini semen.

Ključne besede: hladna plazma, kalitveni testi, koreninske komore, glivni testi

Uvod

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*) je pogosto gojena poljščina. Hkrati je tudi ena izmed najstarejših poljščin, ki izvira iz Azije (Woo in sod. 2016) in ob dejstvu, da ne vsebuje glutena ter da je relativno nezahtevna za gojenje, povpraševanje in potreba po ajdi le še narašča (Li in Zhang, 2001). Nezahtevnost pridelave ajde igra ključno vlogo, saj je tako primerna tudi za ekološko pridelavo (Popović in sod., 2014), ki je v zadnjem času precej popularna pri končnih uporabnikih, hkrati pa je temelj trajnostnega razvoja kmetijstva, ki stremi k temu da je okolju prijazen in brez uporabe umetnih gnojil in pesticidov. Ob takšni kultivaciji pa se soočamo s številnimi mikroorganizmi, ki potencialno kontaminirajo semena ajde, predvsem pri samem skladiščenju. Večinoma gre za bakterije in glive, ki povzročajo težave na vseh stopnjah pridelave ajde (Milevoj, 1989) in letno povzročijo 20-30% izgubo pridelka (Adhikari in sod. 2020). Sama kontaminacija ne vpliva le na slabšo kaljivost semen, ampak predstavlja tudi nevarnost zastrupitve za ljudi in živali, saj glive proizvajajo sekundarne metabolite – mikotoksine (Fung in Clark, 2004). Zaradi zgoraj naštetih razlogov je dekontaminacija samih semen ključnega pomena, saj se tako zaščitimo pred potencialnimi zastrupitvami, hkrati pa preprečimo ekonomske izgube (Sivachandiran in sod. 2017). Cilj same dekontaminacije je odstranitev nezaželenih mikroorganizmov iz površine semen, hkrati pa obdržati seme čim bolj intaktno in užитno. Problem konvencionalnih metod odstranjevanja patogenov (npr. kemične metode) je ta, da mikroorganizmi razvijejo odpornost, hkrati pa ima uporaba fungicidov negativne posledice za okolje (Adhikari in sod. 2020). Zaradi tega se išče alternativne možnosti dekontaminacije semen in ena izmed perspektivnih je uporaba hladne plazme (Adhikari in sod. 2020, Sivachandiran in sod. 2017). Hladna plazma (HP) je ioniziran plin, ki ga ustvarimo tako, da izbran plin izpostavimo radijskim frekvencam, mikrovalovom, pulzirajočemu ali izmeničnemu električnemu toku. To rezultira v nastanku reaktivnih zvrsti, elektronov, ionov, molekul in UV sevanja (Sivachandiran in sod. 2017). Zaradi same nizke temperaturne narave tovrstne obdelave s hladno plazmo je ta postopek primeren za obdelavo bolj občutljivih bioloških materialov. Obstajajo številne raziskave, ki so že pokazale uspešnost pri dekontaminaciji semen, rastil ter in vitro kultur. V kolikor bi želeli zadevo narediti bolj vesplošno uporabno, bi bilo potrebno metodo bolje preučiti in standardizirati, kar bi zahtevalo več študij na tem področju. Zagotoviti bi morali tudi vitalnost kalčkov in rastlin, ki bi zrastle iz tako obdelanih semen. Nekaj študij je sicer pokazalo, da obdelava s hladno plazmo lahko celo poviša kaljivost semen (Adhukari in sod. 2020). V raziskovalnem delu smo opazovali vpliv obdelave z atmosfersko hladno plazmo na kalitev in dekontaminacijo semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*), hkrati pa smo opazovali njen vpliv glivno združbo, ki naseljuje semena. Pri testu kaljivosti smo pričakovali višjo stopnjo kaljivosti v primerjavi s kontrolo, pri dekontaminaciji semen pa smo pričakovali manj različnih vrst gliv ter manjšo stopnjo glivne kolonizacije ob daljši časovni obdelavi semen s hladno plazmo.

Hipoteze:

- Semena obdelana s SBD plazmo bodo enako uspešno kalila.

- Raznolikost površinskih gliv, ki kontaminirajo semena ajde, bo padala z daljšim časom izpostavljenosti SBD plazmi.

Materiali in metode

Obdelava semen s plazmo

Semena ajde, ki smo jih uporabili v poskusih so bila pred tem na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani obdelana z atmosfersko HP z uporabo naprave SBD (angl. »surface barrier discharge«). Za generacijo plazme smo uporabili zrak iz okolice, parametri pri katerih smo generirali plazmo pa so bili sledeči: tok 2,5 A, napetost 20 V in moč 50 W. Semena so bila razdeljena v tri skupine in plazmi izpostavljena za 1, 3 ali 6 minut. Uporabili smo tudi kontrolna semena, ki hladni plazmi niso bila izpostavljena.

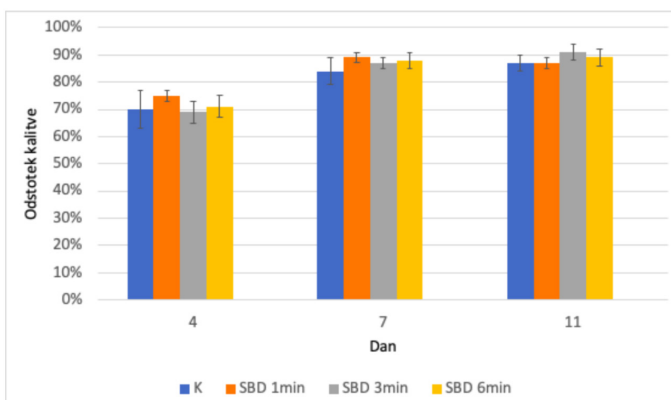
S semeni smo opravili kalitvene teste, meritve rasti in mase korenin ter poganjkov, ovrednotili pa smo tudi vpliv SBD plazme na dekontaminacijo gliv v semenih.

Kalitveni test

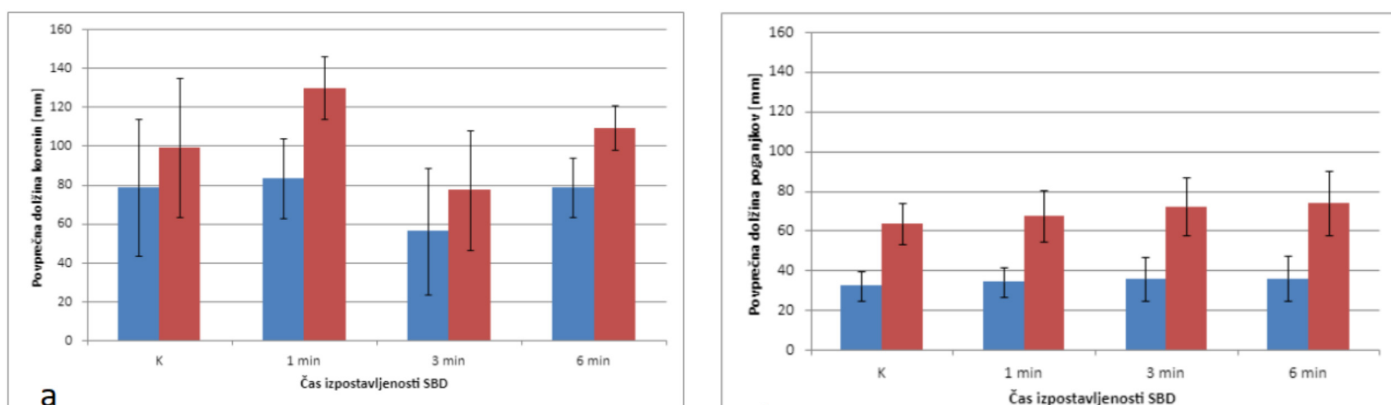
Kalitveni test smo izvedli v petrijevkah, na omočenem filtrirnem papirju. Uporabili smo po 100 semen ajde iz kontrolne skupine in iz vsake skupine semen, obdelanih s HP (1, 3 in 6 minut izpostavljenosti), jih razdelili med 5 petrijevk (po 20 semen na petrijevko) ter le-te prenesli v kartonaste škatle (v temo). Te smo nato postavili v rastno komoro s kontroliranimi pogoji (T=24 °C (dan, 16h) in 20 °C (noč, 8h), relativna zračna vlažnost = 60-70%, tema). Po 2., 4., 7. in 11. dneh smo prešteli število semen, ki so skalila. Kot skaljena semena smo šteli tista, pri katerih je bila vidna koreninica (radikula), ki je prodrla skozi semensko ovojnico.

Meritve rasti korenin in poganjkov

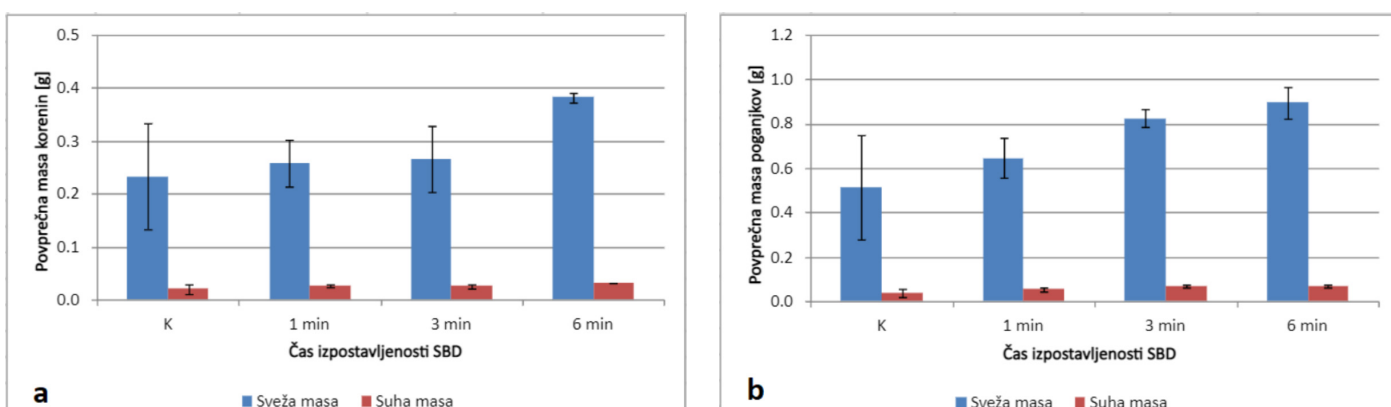
Meritve rasti korenin in poganjkov smo izvedli v koreninskih komorah. Vse 3 skupine semen, obdelanih s SBD plazmo, smo v treh paralelkah po 10 prenesli v koreninske komore, v katere smo namestili vlažno peno, dva sloja filtrirnega papirja in moder papir. Na enak način smo pripravili tudi tri paralelke s po 10 semeni iz kontrolne skupine. Tako pripravljene koreninske komore smo dali v škatle in odnesli v rastno komoro (dnevno-nočni cikel 16/8h, T = 24 °C (dan) in 20 °C (noč),



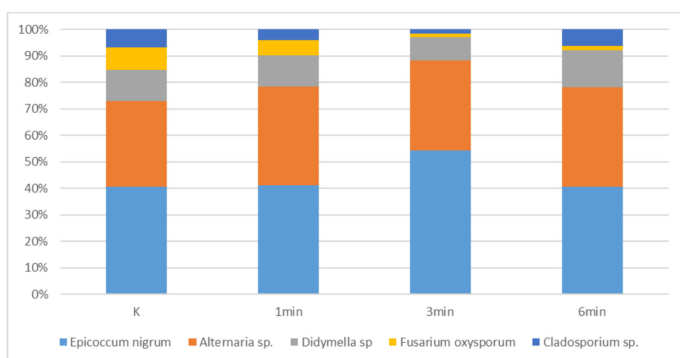
Slika 1: Delež kalitve semen navadne ajde po dnevih v odvisnosti od posamezne izpostavitve plazmi v primerjavi s kontrolo. Prikazane so povprečne vrednosti deleža kalitve in standardna napaka (n=5).



Slika 2: Dolžina korenin (a) in poganjkov (b) semen ajde, ki smo jih izpostavili SBD plazmi. K ni bila izpostavljena plazmi. Prikazane so povprečne vrednosti semen, ki so skalila (razvila korenine/poganjek) \pm standardna napaka ($n=3$).



Slika 3: Masa korenin (a) in poganjkov (b) semen ajde po izpostavitvi SBD plazmi. K ni bila izpostavljena plazmi. Prikazane so povprečne vrednosti \pm standardna napaka ($n=3$).



Slika 4: Diverziteteta gliv izoliranih s površine semen ajde glede na čas obdelave semen z atmosfersko hladno plazmo z uporabo naprave SBD.

relativna zračna vlažnost = 60-70%). Po 4., 7. in 11. dneh smo slikali vse koreninske komore in nato s pomočjo programa ImageJ izmerili dolžine korenin in poganjkov. Po 11. dneh smo teste razdrli in rastlinam odrezali poganjke in korenine. Nato smo stehali sveže mase korenin in poganjkov. Korenine in poganjke smo nato zavili v aluminijasto folijo in posušili v sušilniku (48h, 65 °C). Nato smo stehali še suhe mase korenin in poganjkov.

Glivni testi

Za izolacijo gliv s semen ajde smo semena dali na 2 % gojišča

PDA z dodanim antibiotikom kloramfenikolom (50 mg/L). Na gojišča smo dali v desetih paralelkah po pet semen ajde, obdelane s SBD plazmo (1, 3 in 6 minut) ter kontrolnih semen ajde (neobdelana semena, t.i. pozitivna kontrola). Za negativno kontrolo pa smo uporabili semena ajde, predhodno površinsko sterilizirana s 30 % vodikovim peroksidom za 20 minut. Petrijevke smo ovili s parafilmom in prenesli v kartonasto škatlo, tako da so bile plošče v temi in jih gojili na sobni temperaturi (22 °C). Po enem tednu smo na ploščah zrasle glive morfofipizirali, tako da smo jih razvrstili v skupine glede na barvo (iz zgornje in spodnje strani), površino in obliko micelija ter tip rasti. Na podlagi morfoloških značilnosti smo ocenili število različnih gliv, ki so zrasle iz posameznih semen. Nato smo na novo gojišče PDA nacepili po dva predstavnika vsakega morfofipa in le-te gojili še en teden, tako da smo dobili čiste kulture. Nato pa smo glive identificirali vsaj do nivoja rodu s pomočjo določevalnega ključa.

Rezultati

Semena obdelana z atmosfersko HP z uporabo naprave SBD ne kažejo statistično značilnih razlik v kalitvi (slika 1) v primerjavi z neobdelanimi. Semena so torej ne glede na trajanje obdelave kalila enako uspešno pri vseh skupinah. Prav tako je opaziti, da večina semen, ki po 4 dneh še ni skalila, uspešno kalila po zadnjem (11) dnevu opazovanja; na koncu je bilo skaljenih v povprečju 87% semen. Statistično značilnih razlik nismo

opazili ne pri testu kaljivosti (slika 1), niti pri dolžini korenin in poganjkov (slika 2). Prav tako razlik ni bilo ne pri sveži in suhi masi korenin in poganjkov (slika 3).

Povprečna dolžina korenin (slika 2a) je bila najdaljša pri semenih, ki so bila izpostavljena SBD plazmi 1 min, sledi 6 min izpostavitve, kontrola (K), ki ni bila izpostavljena plazmi. Najkrajše korenine so zrasle iz semen, ki so bila izpostavljena plazmi 3 min. Kalitev je bil pri kontroli 78,3%, pri 1 min 83,3%, pri 3 min 96,6% in pri 6 min 96,6%. Povprečna dolžina poganjkov (slika 2b) je bila najdaljša pri času izpostavljenosti 6 min, nato pa rahlo pada s krajšanjem časa izpostavljenosti. Najkrajši poganjki so zrasli iz kontrolnih semen. Razvoj poganjkov je bil pri kontroli 66,6%, pri ostalih časovnih točkah pa so bili deleži enaki kot pri razvoju korenin.

Sveža in suha masa korenin in poganjkov (slika 3a in 3b) je bila največja pri najdaljši izpostavitvi hladni plazmi (6 min), nato pa je padala s krajšanjem časa izpostavitve. Najmanj so tehtale korenine in poganjki kontrolnih semen.

Pri vsaki obdelavi smo na plošče postavili 50 semen in opazovali razrast površinskih gliv. Pri vseh obdelavah je bila okuženost 100% (slika 4), kar pomeni da smo okoli vsakega semena opazili razrast vsaj enega tipa glive (v manj kot 5% smo dobili tudi razrast kvasovk, kar pa smo zanemarili in opazovali zgolj glive). Semena smo ohranili cela, zato je bila možnost izolacije endofitov minimalna. Iz semen smo izolirali 5 različnih tipov gliv, ki smo jih določili zgolj na podlagi fizioloških značilnosti, zato težko govorimo o natančni klasifikaciji. Domnevno smo izolirali *Epicoccum nigrum*, *Alternaria* sp., *Didymella* sp., *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium* sp., pri čemer sta bila *Epicoccum* in *Alternaria* skupaj pri vseh tretmajih prisotna v več kot 70%.

Diskusija

Obdelava semen s SBD plazmo v našem primeru ni povzročila nikakršnih sprememb v primerjavi s semeni, ki niso bila obdelana s SBD plazmo, kar se ne sklada z rezultati že izvedenih študij (Guo in sod. (2018)). Pričakovan rezultat je bil, da bo kaljivost boljša zaradi odstranjevanja površinskih mikroorganizmov in vpliva na površino semen (bolj hidrofilna) ter posledično boljši privzem vode (Guo in sod. (2018)). Glede na raziskavo Park in sod. (2018) lahko upravičeno sklepamo, da smo uporabili prekratek čas izpostavljenosti plazme oz. premajhno moč plazme, če bi ohranili trenutne čase obdelave. V raziskavi Park in sod. (2018) so bila semena (sicer ječmenova vendar principi kaljenja niso tako zelo drugačni kot pri ajdi) po obdelavi s plazmo razpokana in kazala znake površinske erozije semenske ovojnice. Rast takih semen je rezultirala v najmanj 15% in največ 110% povečanju v primerjavi z neobdelano kontrolo. V našem primeru nismo zaznali nikakršnih vidnih razlik v površinski eroziji med kontrolo in vsemi obdelanimi vzorci. Nespremenjena zunanost semen in nespremenjena glivna združba nakazuje, da naša plazma ni bila dovolj močna, da bi povzročila prej naštete spremembe, ki omogočijo večji % kaljivosti. V prid predpostavki o premajhni moči plazme kažejo tudi ostali rezultati, saj tudi pri rastnih parametrih kalic ni prišlo do statistično značilnih sprememb. Pridobljeni rezultati so dodatni pokazatelj našega suma, da smo uporabili premajhno moč plazme. Ob povečanju moči plazme bi se tako lahko znebili tudi vseh površinskih gliv in bakterij (površinsko

razkuževanje). Njihova prisotnost je za kalitev neugodna, saj porabljajo hranila, ki bi bila drugače dostopna semenu in hkrati predstavljajo možnost za okužbo rastline. V raziskavi so ugotovili, da površinsko razkuževanje ugodno vpliva na kaljenje in rast. (Puligundla in sod., 2017). Razkuževanje ugodno vpliva na večino rastlin, z izjemo tistih, ki so od površinskih gliv odvisne (npr. orhideje). Za naslednje eksperimente predlagamo preliminarne poskuse prek širokega spektra različnih moči plazme in nato postopno zoževanje na pogoje, ki statistično značilno vplivajo na opazovane parametre, predvsem zmanjšajo okužbo z glivami in hkrati ne poškodujejo rastline v preveliki meri.

Zaključek

Tekom svojega raziskovanja smo videli, da obdelava semen s SBD plazmo ni imela velikega učinka na semena ajde z vidika kaljenja, rasti in zmanjšanja prisotnosti površinskih gliv. Prvo hipotezo smo potrdili; semena, obdelana s SBD plazmo so se v kalitvenih testih in koreninskih komorah odrezala enako dobro kot kontrola, kar smo pričakovali glede na raziskano literaturo. Raznolikost površinskih gliv (druga hipoteza) se s podaljševanjem izpostavljenosti SBD plazmi ni zmanjševala, temveč ostala približno enaka. Pojavili so se isti rodovi gliv, razmerja med njimi so se le malo razlikovala. Predlagamo, da bi poskuse ponovili, tako da bi povečali moč plazme in poskušali z različnimi časi izpostavljenosti.

Reference

- Adhikari B, Pangomm K, Veerana M, Mitra S, Park G, 2020. Plant Disease Control by Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma. *Frontiers in Plant Science*, 11: 77
- Sivachandiran L, Khacef A, 2017. Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. *RSC Advances*, 4, 7: 1822–1832
- Woo S-H, Roy SK, Kwon SJ, Cho SW, Sarker K, Lee M-S, Chung K-Y, Kim H-H, 2016. Concepts, Prospects, and Potentiality in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench): A Research Perspective. V: *Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat*. 1st ed. Zhou s sod (ur.). Oxford, Academic Press: 21–49
- Popović, V., Sikora, V., Berenji, J., Filipović, V., Dolijanović, Ž., Ikanović, J., & Dončić, D. (2014). Analysis of buckwheat production in the world of Serbia. *Ekonomika Poljoprivrede*, 61(1), 53-62. <https://doi.org/10.5937/ekopolj1401053p>
- Milevoj, L. (1989). Buckwheat diseases. In I. Kreft (Ed.), *Fagopyrum* (Buckwheat newsletter) (Vol. 9, pp. 31-40). Biotehniška fakulteta.
- Fung, F., & Clark, R. F. (2004). Health effects of mycotoxins: A toxicological overview. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 42(2), 217-234. <https://doi.org/10.1081/CLT-120030947>
- 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, 2: 120–131
- Park, Y., Oh, K. S., Oh, J., Seok, D. C., Kim, S. B., Yoo, S. J., Lee, M. J. 2018. The biological effects of surface dielectric barrier discharge on seed germination and plant growth with barley. *Plasma Processes and Polymers*, 15, 2: 1–8 <https://doi.org/10.1002/ppap.201600056>
- Puligundla, P., Kim, J. W., Mok, C. 2017. Effects of Nonthermal Plasma Treatment on Decontamination and Sprouting of Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 6: 1093–1102

Vpliv obdelave semen navadne ajde z atmosfersko DBD hladno plinsko plazmo na razkuževanje, kalitev in rast kalic

Miona Kovachevikj, Ana Kukenberger, Maja Marinčič, Špela Rozman

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

- Navadna ajda je čedalje bolj zaželeno v prehrani zaradi visoke vsebnosti antioksidantov in prehranske vlaknine, zato smo jo vzeli za predmet raziskave. Semena navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) smo obdelali z atmosfersko DBD (angl. »dielectric barrier discharge«) hladno plazmo, ki je ioniziran plin, pogosto jo označujemo tudi kot četrto agregatno stanje. DBD plazma je nizkotemperaturna in deluje pri atmosferskem tlaku. Želeli smo ugotoviti potencialen vpliv obdelave s plazmo na kalitev in možnost površinskega razkuževanja semen ajde.
- Semena smo najprej v različno dolgih časovnih intervalih izpostavili DBD plazmi. Za glivne teste smo semena prenesli na gojišče iz krompirjevega dekstroznega agarja (PDA). Prisotne glive smo najprej izolirali in nato identificirali glede na morfološke lastnosti. Kalitvene teste smo izvedli v petrijevkah s filtrirnim papirjem in vodo. Po enem tednu smo prešteli semena, ki so kalila. Za rastne teste smo semena prenesli v koreninske komore. Po 7. dneh rasti smo posebej izmerili dolžino poganjkov in korenin ter jih tehtali. Sledilo je sušenje le-teh in tehtanje suhe mase.
- Obdelava semen navadne ajde z DBD plazmo nima statistično značilnega vpliva na kalitev, razvoj ali rast rastlin. Prav tako nismo ugotovili nobenega vpliva na število kontaminiranih semen in prisotnost ter raznovrstnost gliv.

Ključne besede: ioniziran plin, površinsko razkuževanje, glive, stres, kalitev

Uvod

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*) je tradicionalno psevdožito v Sloveniji, ki je vedno bolj popularno zaradi svoje hranilne vrednosti. Okuženost semen z glivami lahko zavira kalitev semen in kasneje rast in razvoj rastline, kar vodi v slabši donos in ekonomsko škodo (Mravlje in sod., 2021). Zaradi negativnega vpliva fungicidov na okolje, se raziskuje uporabo hladne plazme kot alternativno, okolju prijazno metodo površinskega razkuževanja semen. Prav tako obdelava s plazmo semenom predstavlja blažji stres, kar lahko povzroči boljše rast rastlin in večjo biomaso (Ivankov in sod., 2021).

Izvedene so bile že raziskave obdelave semen ajde z različnimi tipi plazme, različnimi delovnimi plini in pri različnih tlakih (Ivankov in sod., 2021; Mravlje in sod., 2021; Šerá in sod., 2012). Optimalen čas izpostavitve semen plazmi lahko poveča kalitev semen in biomaso kalic, vendar v teh raziskavah niso preverjali glivne kontaminacije semen pred in po tretmaju (Ivankov in sod., 2021; Šerá in sod., 2012). Dokazali so, da plazma lahko deluje kot sredstvo za površinsko razkuževanje semen ajde, vendar je tudi zavrla kalitev semen (Mravlje in sod., 2021). Do sedaj še ni bilo narejene raziskave na semenih ajde z uporabo atmosferske DBD plazme.

Plazma je ioniziran plin, pogosto jo označujemo tudi kot četrto agregatno stanje. DBD plazma je nizkotemperaturna plazma, ki deluje pri atmosferskem tlaku. Naprava je sestavljena iz dveh elektrod med katere položimo vzorec. Elektrodi z uporabo električnega toka ionizirata zrak in ga spremenita v plazmo (Bogaerts in sod., 2002).

Namen raziskave je bil ugotoviti vpliv obdelave semen s tremi časovnimi intervali izpostavitve atmosferski DBD hladni plazmi na kalitev in razkuževanje semen navadne ajde. Predpostavljamo, da bodo semena pri krajših izpostavitvah boljše kalila, hkrati pa bo manj semen okuženih z glivami, v primerjavi s semeni, ki niso bila izpostavljena plazmi.

Hipoteze

- Plazma bo površinsko razkužila semena. Na semenih z daljšim časom izpostavitve bo manj različnih vrst gliv.
- Krajša izpostavitvev semen plazmi bo spodbudila kalitev, rast in razvoj ajde. Daljša izpostavitvev pa bo povzročila poškodbo semen in zaviranje kalitve.

Materiali in metode

Naš poskus je potekal v časovnem obdobju dveh tednov. V tem času smo opravili kalitveni test, rastni test in glivni test. V drugem tednu smo tudi stehali svežo biomaso kalic in nato po sušenju še suho biomaso.

Materiali

Semena ajde so bila pridobljena iz Mlina Rangus, Šentjernej, Slovenija. Obdelava semen s hladno DBD plazmo je bila izvedena v sodelovanju z Oddelkom za lesarstvo na Biotehniški fakulteti UL.

Obdelava s plazmo

Semena navadne ajde smo obdelali s hladno DBD plazmo pri atmosferskem tlaku, vir plina za nastanek plazme je bil zrak. Plazma je delovala pri pogojih: tok 1,5A, napetost 15V in moč 25W. Semena smo izpostavili plazmi za 5, 15 in 30 sekund.

Kontrolna skupina semen ni bila obdelana s plazmo.

Glivni testi

Po 5 semen vseh časovnih intervalov obdelave s plazmo (5, 15 in 30 sekund), pozitivno (neobdelana semena) in negativno kontrolo, ki je bila klasično površinsko razkužena (20 min s 30 % vodikovim peroksidom) smo sterilno prenesli na 2 % gojišče krompirjevega dekstroznega agarja (PDA) z dodanim antibiotikom kloramfenikolom (50 mgL⁻¹). Za vsako serijo smo naredili 10 paralelk. Nato smo plošče inkubirali na sobni temperaturi v temi. Po 7 dneh smo ocenili koliko različnih morfoloških tipov gliv (morfortipov) je zrastle na gojiščih in nato smo po dva predstavnika vsakega glivnega morfortipa prenesli na novo ploščo z 2% gojiščem PDA, da smo pridobili čiste kulture. Po enem tednu gojenja smo opravili morfološko identifikacijo gliv vsaj do nivoja rodu. Glive smo razvrstili v kategorije na osnovi barve na zgornji in spodnji strani, oblike rasti in drugih lastnostih.

Kalitveni testi

Kalitvene teste smo izvajali v petrijevkah s filtrirnim papirjem in 3 ml vode. V vsako petrijevko smo dali 20 semen, za vsako skupino semen (vse 3 plazemske obdelave in kontrola) smo naredili po 5 ponovitev, tako da smo imeli skupaj 100 semen na skupino. Kalitvene teste smo dali v rastno komoro v temo z dnevno-nočnim ciklom 16/8h, temperaturo dneva 24°C in noči 20°C ter 60 % relativno zračno vlažnostjo. Kalitev semen smo prešteli po 24 urah, po 4. dneh in po 7. dneh.

Rastni testi

Za test rasti smo uporabili koreninske komore, ki so bili sestavljeni iz plasti pene, dveh filtrirnih papirjev in enega navadnega temnega papirja. Vse skupaj je bilo navlaženo in vpeto v dva prosojna plastična modela. V eno koreninsko komoro smo postavili po 10 semen. Za vsako serijo (vse 3 plazemske obdelave in kontrolna skupina) smo naredili 3 ponovitve. Postavili smo jih v rastno komoro z dnevno-nočnim ciklom 16/8h, temperaturo dneva 24°C in noči 20°C ter 60% relativno zračno vlažnostjo.

Meritve dolžin poganjkov in korenin ter določanje sveže in suhe biomase

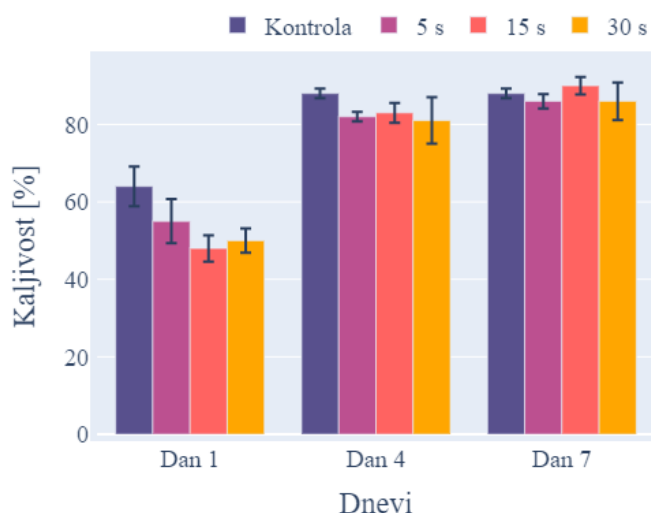
Po sedmih dneh rastnih testov smo te razdri, izmerili dolžine korenin in poganjkov ter stehali sveže mase poganjkov in korenin direktno iz koreninskih komor. Nato smo jih sušili 4 dni pri 60 °C in ponovno stehali suhe biomase.

Rezultati

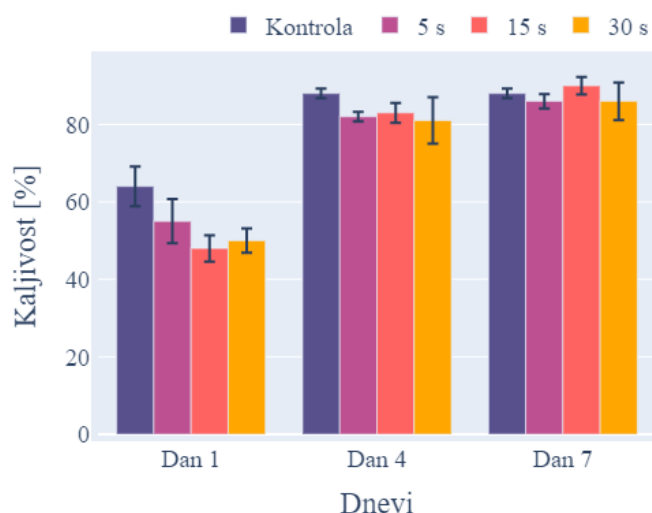
Vpliv plazme na kaljivost semen

Obdelava semen z DBD plazmo nima statistično značilnega vpliva na kaljivost semen (slika 1). Glede na kontrolno skupino, ki ni bila obdelana z DBD plazmo, nismo opazili statistično značilnih razlik v stopnji kaljivosti niti po enem, štirih ali sedmih dneh.

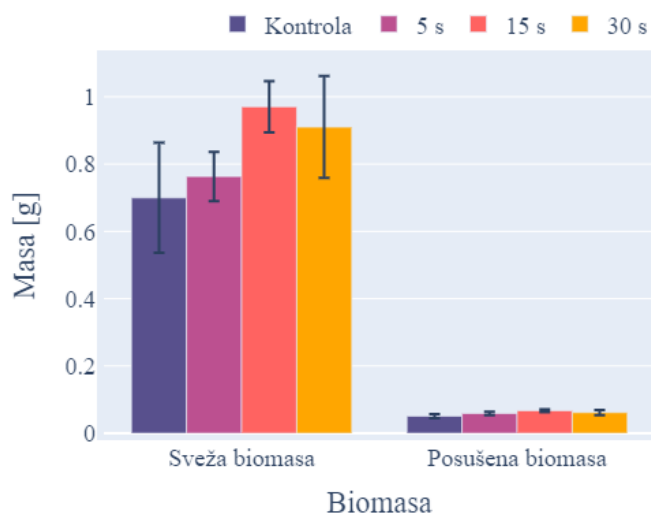
Vpliv obdelave z DBD plazmo na rast in biomaso kalic Obdelava semen z DBD plazmo na dolžine poganjkov ni imela statistično značilnega vpliva (Slika 2). Obdelava s plazmo je statistično značilno vplivala le na rast korenin kalic pri 15



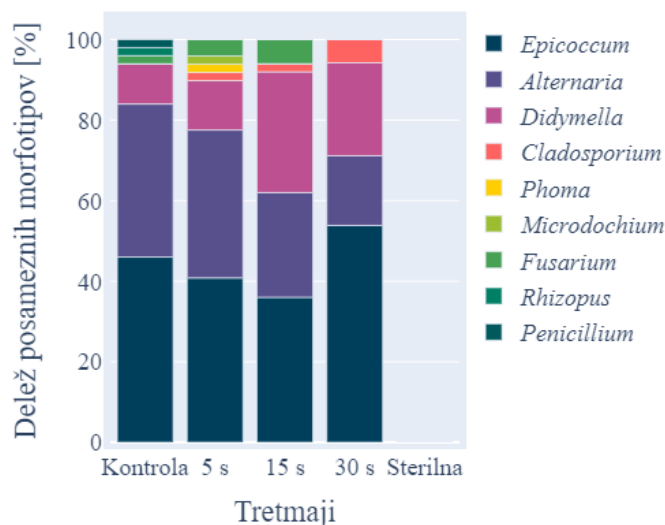
Slika 1: Graf povprečnih deležev kalečih semen s pripadajočimi standardnimi napakami navadne ajde, ki so bila obdelana z DBD plazmo (5, 15 in 30 s) pri posameznih dneh opazovanja po izvedbi kalitvenega testa (1., 4. in 7. dan). Kontrola so semena navadne ajde, ki z DBD plazmo niso bila obdelana ($n = 5$). 5 s – 5 sekundna izpostavitvev DBD plazmi; 15 s – 15 sekundna izpostavitvev DBD plazmi; 30 s – 30 sekundna izpostavitvev DBD plazmi.



Slika 2: Povprečne dolžine s pripadajočimi standardnimi napakami poganjkov in korenin kalic pri kontroli in semenih, ki so bila 5, 15 oziroma 30 sekund izpostavljena DBD plazmi. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med posameznimi obdelavami (enosmerna ANOVA, Tukeyjev post-hoc test, $p < 0,05$). 5 s – 5 sekundna izpostavitvev DBD plazmi; 15 s – 15 sekundna izpostavitvev DBD plazmi; 30 s – 30 sekundna izpostavitvev DBD plazmi.



Slika 3: Povprečne mase s pripadajočimi standardnimi napakami biomase svežih in posušenih kalic ajde. 5 s – 5 sekundna izpostavitvev DBD plazmi; 15 s – 15 sekundna izpostavitvev DBD plazmi; 30 s – 30 sekundna izpostavitvev DBD plazmi.



Slika 4: Graf deleža posameznih morfotipov na površini semen pri posameznih tretmajih. 5 s – 5 sekundna izpostavitvev DBD plazmi; 15 s – 15 sekundna izpostavitvev DBD plazmi; 30 s – 30 sekundna izpostavitvev DBD plazmi; Sterilna – 20 minutno razkuževanje semen navadne ajde s 30% vodikovim peroksidom. Kontrola so bila neobdelana semena ajde.

sekundni izpostavitvi plazmi na 7. dan opazovanja in sicer jo je glede na kontrolo nekoliko zmanjšala.

Pri ugotavljanju razlik v biomasi kalic nismo zaznali statistično značilnih razlik niti v primeru sveže biomase, niti v primeru suhe biomase kalic ajde (Slika 3).

Vpliv obdelave s plazmo na glive

Obdelava s hladno plazmo ni imela vpliva na razkuževanje semen, saj so bila po vseh izpostavitvah plazmi vsa semena ajde okužena z glivami.

Glive smo glede na morfološke lastnosti razdelili v morfotipe in jih opisali. S pomočjo določevalnega ključa smo glive določili vsaj do rodu. Diverzitetni diagram (Slika 4) prikazuje delež posameznih gliv za vsako časovno obdelavo. Pri kontroli smo našli 6 različnih morfotipov. Pri 20 minutni površinski sterilizaciji semen ajde s 30% vodikovim peroksidom, nismo opazili nobene glivne okužbe (sterilna kontrola). Največ različnih morfotipov gliv smo opazili pri 5 sekundni obdelavi in sicer 7. Med vsemi vzorci smo največkrat opazili glive iz rodu *Epicoccum*. Pogosto so bile zastopane tudi glive iz rodov

Alternaria in *Didymella*. Ostale glive so se pojavljale redkeje.

Diskusija

V naši raziskavi smo pokazali, da obdelava semen ajde z DBD plazmo, pri danih pogojih, ne vpliva na kalitev, rast, biomaso in površinsko okuženost semen z glivami. Semena ajde so občutljiva na izpostavitve plazmi, kar pomeni, da dobljeni rezultati zelo variirajo glede na izpostavitveni čas, vrsto plazme in moč (Mravlje in sod., 2021; Šerá in sod., 2012). Zaradi vseh različnih parametrov, ki vplivajo na končne rezultate je težko primerjati študije med seboj. Poročali so, da je 180 s oziroma 600 s izpostavitve semen GlidArc hladni plazmi povzročila boljše kalitev oziroma boljše rast kalic, medtem ko 3-10 minutna izpostavitve SDBD (angl. »surface dielectric barrier discharge«) plazmi oziroma izpostavitve semen DMP (angl. »downstream microwave plasma«) plazmi povzroči zaviranje kalitve (Šerá in sod., 2012). Ivankov in sodelavci (2021) so v svojih raziskavah ugotovili, da izpostavitve semen hladni plazmi za 5 ali 7 minut lahko rahlo pospeši čas kalitve ajde, vendar ne vpliva na končni odstotek kaljivosti semen. So pa zabeležili, da obdelava semen s hladno plazmo povzroči povečanje biomase listov, korenin in donosa v rastlinah posajenih na polju (Šerá in sod., 2012). Mravlje in sodelavci (2021) so v svojih raziskavah opazili ravno obratni učinek kot Ivankov in sodelavci (2021), obdelava semen s hladno plazmo do 45 s sicer ni vplivala na končen delež kalitve semen, je pa povzročila zakasnitev kaljenja semen. 60 s izpostavitve pa je povzročila zmanjšano stopnjo kalitve, izpostavitve daljše od 90 s pa so dokončno zavrle kalitev semen (Mravlje in sod., 2021). Dosedanje raziskave na ajdi torej nakazujejo, da obdelava semen s plazmo lahko spodbudi rast in poveča biomaso rastlin, zmanjša oziroma popolnoma zavre kalitev semen ali pa ne povzroči spremembe (Ivankov in sod., 2021; Mravlje in sod., 2021; Šerá in sod., 2012).

DBD plazma do sedaj še ni bila uporabljena na semenih ajde, zato je težko primerjati naše rezultate z rezultati drugih raziskav, saj so bile raziskave narejene na drugih rastlinskih vrstah. Obdelava semen z DBD plazmo stanjša semensko ovojnico in posledično poveča privzem vode v seme (Billah in sod., 2020; Mazandarani in sod., 2020; Molina in sod., 2021). Semena ječmena privzemajo več vode in posledično boljše kalijo po 15 s tretmaju s 40 in 80 W DBD plazmo, 15 s obdelava s 120 W pa povzroči dehidracijo semen (Mazandarani in sod., 2020). Semena fižola mungo so obdelali z DBD plazmo moči 45 W v različnih časovnih intervalih od 20 do 180 s. Stopnja kaljivosti se je povečevala do 120 s, pri 180 s obdelavi pa je rahlo padla, prav tako je izpostavitve plazmi izboljšala privzem vode v seme (Billah in sod., 2020). Tudi semena pšenice so se podobno odzivala na obdelavo z DBD plazmo moči 30 W in časovnem intervalu 10-900 s (Molina in sod., 2021). Ugotovili so, da kaljivost semen pšenice s časom tretmaja narašča do 200 s nato pa začne rahlo padati (Molina in sod., 2021). Iz teh primerov je razvidno, da se različna semena med seboj razlikujejo, vendar imajo vsa neko optimalno območje bodisi moči plazme ali pa časa izpostavitve, ki spodbuja kalitev semen in rast kalic. V naštetih raziskavah so uporabljali plazme večjih moči od 25 W in pogosto daljše časovne intervale od 5 do 30 s, kot mi v naši raziskavi. To nakazuje na potrebo po nadaljnjih testih na semenih ajde, bodisi testiranje daljših obdelav z DBD plazmo, uporabo močnejše plazme ali pa podrobnejšo analizo semen (analiza privzema vode), da bi lahko opredelili kašen

vpliv ima DBD plazma, oziroma ali sploh ima vpliv na semena ajde, njihovo kalitev in maso kalic.

Na semenih ajde smo identificirali glive rodov *Alternaria*, *Cladosporium*, *Didymella*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Microdochium*, *Penicillium*, *Phoma* in *Rhizopus*. Med različnimi obdelavami ni bilo razlik v deležu okuženih semen in raznovrstnosti gliv. Na semenih so prevladovali rodovi *Alternaria*, *Didymella* in *Epicoccum*, ki so predstavljali med 80 in 90% vseh gliv na semenih, njihova pogostost pa se ni razlikovala med posameznimi izpostavitvami plazmi. Ti rodovi gliv se tudi sicer pogosto pojavljajo na semenih ajde (Mravlje in sod., 2021). V vzorcih so se pojavili tudi nekateri manj pogosti rodovi gliv (*Cladosporium*, *Fusarium*, *Microdochium*, *Penicillium*, *Phoma* in *Rhizopus*), njihova prisotnost se je razlikovala med posameznimi izpostavitvami, vendar je to najverjetneje posledica redkosti te glive na semenih in ne vpliva plazme. Hladna plazma se lahko uporablja za površinsko razkuževanje, saj povzroča poškodbe celične membrane, nastali prosti kisikovi radikali pa poškodujejo DNA in posledično povzročijo propad celic mikroorganizmov (Moisan in sod., 2001). Obdelava semen ajde s hladno plazmo (vakuumaska plazma, moči 1500 W, kisik kot delovni plin) daljša od 90 s zmanjša okuženost semen ajde z glivami (Mravlje in sod., 2021). Mravlje in sodelavci (2021) so v raziskavi uporabili drugačen tip plazme od nas, posledično rezultati niso primerljivi. Pri pogojih, ki smo jih uporabili v raziskavi nismo površinsko razkužili semen, kar nakazuje, da bi verjetno morali podaljšati čas izpostavitve plazmi ali njeno moč.

Zaključki

V naši raziskavi smo si postavili dve hipotezi: da bo obdelava semena z DBD plazmo površinsko sterilizirala semena ajde in da bo izpostavitve semen s plazmo vplivala na kalitev, rast in razvoj ajde.

Iz rezultatov raziskave smo zaključili, da obdelava semen z DBD plazmo pri moči 25 W, s časi obdelave 5 s, 15 s in 30 s, nima statistično značilnega vpliva na število kontaminiranih semen in število različnih vrst gliv. Za natančnejšo določitev gliv bi sicer lahko uporabili tudi druge metode, ne le določitev na podlagi morfologije. Za namene te raziskave je določitev rodu gliv na podlagi morfologije zadoščala. Za bolj jasne rezultate so potrebni dodatni poskusi z različnimi močmi plazme in z različnimi časi obdelave.

Tudi pri drugi hipotezi smo ugotovili, da obdelava semen ajde z DBD plazmo pri danih pogojih, nima statistično značilnega vpliva na kalitev, rast in razvoj kalic ajde. Pri kalitvi ajde ni bilo razlik med kontrolo in vsemi tremi izpostavitvami plazmi niti po enem, štirih ali sedmih dneh.

Pri merjenju dolžine poganjkov semen obdelanih s plazmo ni bilo razlik v primerjavi s kontrolo. Statistično značilno krajše so bile le dolžine korenin po 15 s izpostavitvi plazmi na sedmi dan. Prav tako nismo opazili razlik pri sveži ali suhi biomasi.

Reference

1. Billah M, Sajib SA, Roy N C, Rashid MM, Reza MA, Hasan MM, Talukder MR, 2020. Effects of DBD air plasma treatment on the enhancement of black gram (*Vigna mungo* L.) seed germination and growth. Archives of Biochemistry and Biophysics 681. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108253>
2. Bogaerts A, Neyts E, Gijbels R, van der Mullen J, 2002. Gas discharge plasmas and their applications. In Spectrochimica Acta

- Part B Vol. 57.
3. Ivankov A, Naučienė Z, Degutytė-Fomins L, Žūkienė R, Januškaitienė I, Malakauskienė A, Jakštas V, Ivanauskas L, Romanovskaja D, Šlepetienė A, Filatova I, Lyushkevich V, Mildažienė V, 2021. Changes in agricultural performance of common buckwheat induced by seed treatment with cold plasma and electromagnetic field. *Applied Sciences (Switzerland)* 11(10). <https://doi.org/10.3390/app11104391>
 4. Mazandarani A, Goudarzi S, Ghafoorifard H, Eskandari A, 2020. Evaluation of DBD Plasma Effects on Barley Seed Germination and Seedling Growth. *IEEE Transactions on Plasma Science* 48(9):3115–3121. <https://doi.org/10.1109/TPS.2020.3012909>
 5. Molina R, Lalueza A, López-Santos C, Ghobeira R, Cools P, Morent R, de Geyter N, González-Elipe, AR, 2021. Physicochemical surface analysis and germination at different irrigation conditions of DBD plasma-treated wheat seeds. *Plasma Processes and Polymers* 18(1). <https://doi.org/10.1002/ppap.202000086>
 6. 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(5). <https://doi.org/10.3390/plants10050851>
 7. Šerá B, Gajdová I, Černák M, Gavril B, Hnatiuc E, Kováčik D, Kříha V, Sláma J, Šerý M, Špatenka P, 2012. How various plasma sources may affect seed germination and growth. *Proceedings of the International Conference on Optimisation of Electrical and Electronic Equipment, OPTIM, 1365–1370*. <https://doi.org/10.1109/OPTIM.2012.6231880>

Vpliv ekstrakta zrn tatarske ajde na kalitev in glivni mikrobiom zrna koruze

Rok Bajc, David Belaj, Luka Malec, Jona Novljan, Mirna Uran

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

- Namen raziskave je ugotoviti, kako ekstrakt zrn tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) vpliva na prisotnost gliv na zrnih koruze (*Zea mays*) in njihovo kalitev.
- Vpliv na kalitev smo spremljali preko odstotka skaljenih zrn in teže sveže ter suhe biomase 10-dni starih kalic. Vpliv na mikrobiom smo spremljali preko morfološkega določanja gliv na agarških ploščah z zrn. Ekstrakt je vseboval 14% etanola, zato smo poleg kontrolnega poskusa izvedeli tudi poskus s 14% etanolom. Podatke smo nato statistično obdelali.
- Podatki kažejo na boljši odstotek kaljivosti zrn in boljšo rast kalic ob dodatku ekstrakta glede na etanol, vendar slabšo rast kot kontrola. Ekstrakt ajde kot tudi etanol sta zmanjšala število gliv in njihovo diverziteto, kar lahko pripišemo strupenosti etanola.
- Ekstrakt ajde le zmanjša negativne vplive etanola, zato v takšni obliki ni uporaben v kmetijstvu. Zamenjava topila za bolj rastlinam prijaznega bila lahko tema nadaljnjih raziskav.

Ključne besede: biokontrola, fitopatogene glive

Uvod

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) je dvokaličnica, ki izvira iz zahodne Kitajske od koder se je njeno kmetijsko kultiviranje razširilo po svetu (Zhang s sod. 2021). Rastlina je prehransko zanimiva, saj vsebuje večje količine fenolnih spojin, med katere sodi tudi rutin. Polifenoli so antioksidanti in lahko delujejo fungicidno (Kalinova s sod. 2006).

Zrna se tekom pridelave in shrambe lahko okužijo in vsebujejo razne patogene glive, ki lahko negativno vplivajo na kalitev, rast ter razvoj rastline (Halooin 1983). Zaradi negativnih vplivov fungicidov na okolje in njihovih omejitev potrebujemo nove načine obdelave semen (Thind 2021). Eden izmed potencialno zanimivih in okolju prijaznih fungicidov bi bila mešanica naravno prisotnih fungicidov, ki so ekstrahirani iz različnih delov rastlin.

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali ima ekstrakt iz zrna tatarske ajde fungicidno aktivnost, ter kako ekstrakt vpliva na kalitev zrn izbrane kulturne rastline (t.j. koruze) in ali zavira rast prisotnih patogenih gliv.

Naše hipoteze so: i) ekstrakt iz zrn tatarske ajde ima fungicidno aktivnost, saj vsebuje polifenole, ii) ekstrakt ne vpliva na kalitev in rast rastlin, iii) etanol in ekstrakt ne vplivata na rast poganjka, temveč na kalitev, iv) na neobdelanih zrnih je več gliv kot na obdelanih zrnih koruze in v) ekstrakt zmanjša število glivnih okužb v primerjavi s kontrolo, enako ali bolje kot etanol.

Materiali in metode

Rastlinski material

Zrna koruze so bila pridobljena na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Ekstrakt iz zrn tatarske ajde je bil pridobljen po postopku opisan v Pavlinjek s sod. 2022. Zdrobili smo 100 g neoluščenih zrn ajde, namakali v 70% etanolu in dali v ultrazvočno kopel. Zmes smo precedili in centrifugirali ter odvezli supernatant, ki smo ga redčili do 14% etanola.

Izvedba poskusa

Zrna koruze smo obdelali na tri različne načine, in sicer tako, da smo jih namakali 8 ur pri sobni temperaturi v treh različnih raztopinah: vodi, 14% etanolu in ekstraktu. Zrna koruze smo ali sterilno prenesli na potato dextrose agar (PDA) plošče (po eno zrno na ploščo in 20 plošč na obravnavo) ali pa v kalilnih komorah z omočenim filter papirjem (po 5 zrn na komoro in 5 komor na obravnavo). Plošče smo hranili v temi pri sobni temperaturi, komore pa v rastni komori pri pogojih 22 °C, 60 % vlažnost in 16/8 urno fotoperiodo.

Določitev glivnega mikrobioma

Po 7 dneh smo pregledali, če so na ploščah zrasle glive. Prešteli smo število različnih morfotipov na ploščah in na podlagi morfoloških značilnosti določili glive do rodu natančno.

Kalitveni test

Po 7 in 10 dneh smo kalilne komore slikali. Po 10 dneh smo komore odprli, ločili korenine in poganjke, jih stehtali (sveža masa) in sušili 5 dni pri 60°C. Suhim rastlinam smo določili

suho maso.

Sestava PDA gojišča

15 g PDA (potato dextrose agar)
35 mg kloramfenikola
2 žlički agarja
700 mL destilirane vode

Statistična analiza

Rezultate smo analizirali s programom Statistica (v14.0) in jih obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA) in Tukeyevim post-hoc testom (razlike so statistično pomembne pri $p < 0,05$).

Rezultati

Test števila in diverzitete površinskih gliv

Pri zrnih koruze, ki so bila namočena v etanol in ekstrakt smo določili zmanjšanje povprečnega števila glivnih morfotipov v primerjavi s kontrolo (Slika 1). Razlik med zrnji namočenimi v etanolu in ekstraktu ni bilo. Pri zrnih namočenih v destilirano vodo (kontrola) smo opazili 9 različnih morfotipov, pri zrnih namočenih v etanol 3 in pri zrnih namočenih v ekstrakt pa 4. Določili smo 6 Ascomicet, eno Basidiomiceto in dve neznani glivi.

Kalitev

Kalitev zrn koruze, ki so bila namočena v etanol, je bila značilno manjša kot kalitev iz drugih dveh obravnavanj (Slika 2).

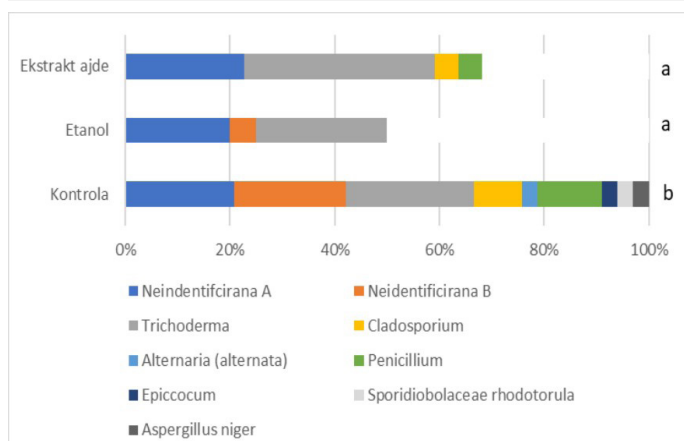
Masa kalic in višina poganjka

Tako sveža kot suha masa sta se odzivali na obravnave (Slika 3). Pri sveži masi ni bilo značilne razlike v povprečni masi kalic med obravnavama z etanolom in ekstraktom ajde, medtem ko suha masa kalic kaže zmanjšanje mase kalic ob obravnavi z etanolom v primerjavi ekstraktom.

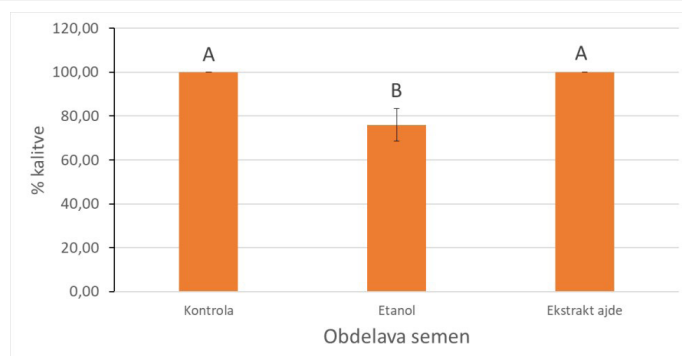
Sedmi dan rasti je bila višina poganjkov pri obravnavi z etanolom in ekstraktom manjša kot pri kontrolni obravnavi (Slika 4). Deseti dan je bila edina značilna razlika v dolžini poganjkov le še med kontrolnimi rastlinami in obravnavi z ekstraktom (Slika 4). Obdelava z ekstraktom je negativno vplivala na rast kalic, obdelava z etanolom pa le 7. dan rasti.

Diskusija

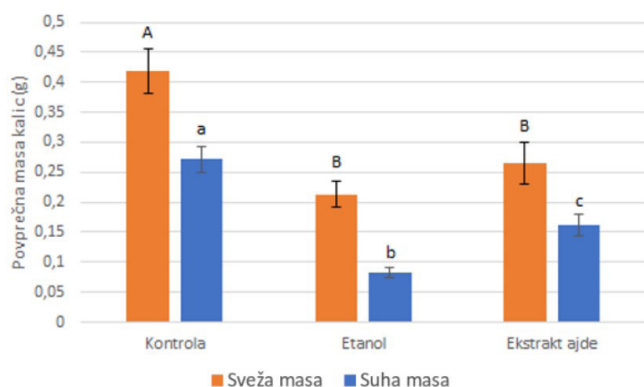
Fungicid, imenovan tudi antimikotik, je vsaka snov, ki s svojim delovanjem ubije ali zavira rast gliv (Encyclopedia Britannica). Glive v kmetijstvu lahko povzročijo veliko škode z zmanjšanjem količine in kakovosti pridelka ter z zmanjšanjem dobička, zato je njihovo zatiranje pomemben vidik agrarnega gospodarstva (Steinberg s sod. 2020). Zaradi razvijanja odpornosti na splošno uporabljene fungicide je pritisk po odkrivanju novih antimikotskih sredstev čedalje večji (Steinberg s sod. 2020). Prav tako pa je zaradi odkrivanja sledi pesticidov in fungicidov v človeški hrani, ter onesnaženja okolja z raznimi biocidnimi spojinami (Brooks in Roberts 1999) prisotna tudi težnja po odkrivanju naravnih ter okolju in človeku prijaznih fungicidov (Yoon s sod. 2012). Del njihovih kandidatnih virov so tudi rastline oz. njihovi (sekundarni) metaboliti. Bioaktivne spojine rastlinskih virov so eterična olja, nekatere maščobne kisline,



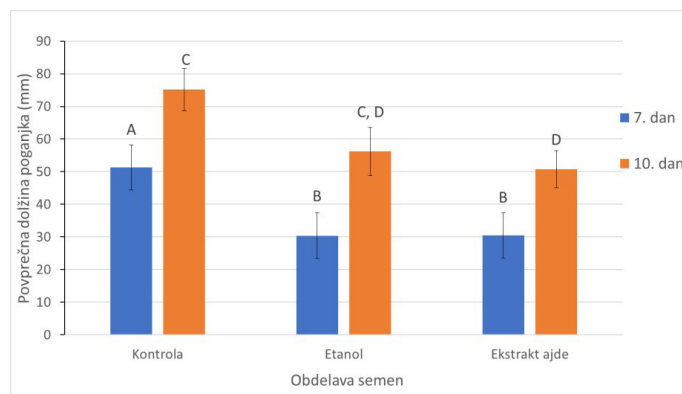
Slika 1: Delež okužb zrn koruze z različnimi morfotipi gliv ali delež ne okuženih semen (%) po namakanju zrn v bidestilirano vodo (Kontrola), v etanolu oziroma v ekstraktu iz zrna tatarske ajde (n=20). Različne črke ob posameznem stolpcu prikazujejo statistično značilno razliko v številu različnih glivnih okužb na seme (Tukey post-hoc test pri $p < 0,05$).



Slika 2: Odstotek kaljenja zrn koruze, ki smo jih namakali v bidestilirano vodo (Kontrola), v etanolu oziroma v ekstraktu iz zrna tatarske ajde. Prikazana so povprečja \pm standardna napaka (n=5), različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med obravnavami (Tukey post-hoc test pri $p < 0,05$).



Slika 3: Sveža in suha masa 10-dni starih kalic koruze, katerih zrna smo namakali v bidestilirano vodo (Kontrola), v etanolu oziroma v ekstraktu iz zrna tatarske ajde. Prikazana so povprečja \pm standardna napaka (n=50), različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med obravnavami za svežo in suho maso posebej (Tukey post-hoc test pri $p < 0,05$).



Slika 4: Višina poganjkov 7-dni in 10-dni starih kalic koruze, katerih zrna smo namakali v bidestilirano vodo (Kontrola), v etanolu oziroma v ekstraktu iz zrna tatarske ajde. Prikazana so povprečja \pm standardna napaka (n=25), različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med obravnavami (Tukey post-hoc test pri $p < 0,05$).

glikozidi, nekatere aminokisliline, alkaloidi in fenolne spojine (Yoon s sod. 2012; Simonetti s sod. 2020).

V našem poskusu smo ocenjevali protimikrobno oz. protiglavno delovanje ekstrakta iz zrn tatarske ajde, ki prav tako vsebuje večje količine fenolnih spojin (Zhong s sod. 2022; Mikulajova s sod. 2016). Rezultati so sicer pokazali zatiranje rasti gliv v primerjavi s kontrolo, vendar pa niso prikazali statistično značilne razlike v primerjavi z obdelavo z etanolom. Ekstrakt ajde je, prav tako kot raztopina etanola, zmanjšal morfološko diverziteto zraslih gliv, kot tudi samo uspešnost rasti določenih gliv. Določen delež agarnih plošč je ob obravnavanju z ekstraktom namreč ostal brez gliv, medtem ko je bil pri kontroli delež plošč z vsaj 1 kolonijo gliv 100%. Predvidevamo, da je bila zmanjšana diverziteta in uspešnost rasti gliv tretiranih vzorcev na račun epifitov na površini semen koruze, ki so bili pod direktnim vplivom ekstrakta oz. etanola.

Glede na to, da med tretiranjem z ekstraktom ajde in raztopino etanola ni bilo razlike v diverziteti in stopnji rasti,

fungicidnega učinka ne moremo neposredno pripisati delovanju ekstrahiranih komponent ajde, saj je znano, da že sama raztopina etanola izkazuje protimikrobno delovanje (Valle s sod. 2016). Sequeira s sod. (2016) so pokazali, da je že 5% raztopina etanola učinkovita pri zaviranju rasti in razvoja gliv. Prav tako so določili minimalno inhibitorno koncentracijo etanola za 12 glivnih vrst, ki znaša 2,14 – 6,43 %, bistveno manj od uporabljene koncentracije v raziskavi.

Kljub temu, da tatarska ajda vsebuje protimikrobne oz. protiglavne učinkovine kot so fenolne spojine, bioaktivni peptidi in organske kisline (Zhou s sod. 2014; Mikulajova s sod. 2016) naši rezultati niso prikazali njihov protiglavni učinek. Za boljše vrednotenje fungicidnih komponent ajde bi bilo v prihodnje potrebno pripraviti očiščene ekstrakte spojin, kjer bi etanol zamenjali z bolj inertnim topilom, ki samo po sebi nima vpliva na rast in razvoj gliv.

Pri preverjanju delovanja potencialnega fungicida za obdelavo semen je vsekakor potrebno preveriti tudi vpliv le-tega na

kaljivost in rast rastlin in zagotoviti, da na rastline nima negativnega vpliva. V tej raziskavi smo vpliv ekstrakta ajde na zrna in mlade rastline preverjali z izvedbo kalitvenih testov ter s spremljanjem hitrosti rasti rastlin. Pri preverjanju kaljivosti koruznih zrn pod vplivom različnih obravnavanj smo opazili, da pri zrnih obdelanih z ekstraktom ajde ni bilo razlike glede na kontrolo (100% kaljivost v obeh primerih), medtem ko je pri tretiranju z raztopino etanola prišlo do negativnega učinka in manjše kaljivosti glede na kontrolo. Dobljeni rezultati so delno pričakovani, saj je znano, da etanol v višjih koncentracijah negativno vpliva na rastline. Raziskave na semenih rdeče smreke (Butnor s sod. 2018), riža (Miyoshi & Sato, 1996) in določenih vrst trav (Salehi s sod. 2008) so pokazale inhibitorne učinke etanola na kalitev semen pri koncentracijah višjih od fizioloških oz. pri koncentracijah nad 3% (v/v). V našem poskusu je bila uporabljena koncentracija etanola tako pri pripravi ekstrakta ajde kot v čisti raztopini 14 % (v/v), precej višja kot v omenjenih raziskavah, tako da lahko predvidevamo, da je etanol negativno vplival na kalitev semen, kar je tudi razvidno iz rezultatov.

Tako pri kaljivosti semen kot tudi pri nadaljnji rasti so rezultati tretiranja z ekstraktom ajde nekoliko nepričakovani; ekstrakt ni imel vpliva na kaljivost glede na kontrolo, izkazala pa se je razlika glede na tretiranje z raztopino etanola, ki je negativno vplivala na kaljivost semen. Na nadaljnjo rast rastlin sta prav tako negativno vplivala ekstrakt ajde kot tudi raztopina etanola, saj sta se povprečna masa kalic in dolžina poganjkov zmanjšali pri obeh obdelavah glede na kontrolo. Iz rezultatov testov kaljivosti bi celo lahko sklepali, da so ekstrahirane komponente ajde nasprotno negativnim učinkom etanola ali pa nekako drugače pozitivno vplivale na razvoj rastlin, saj je bila kaljivost zrn obdelanih z ekstraktom ajde boljša od zrn obdelanih samo z raztopino etanola. Rezultatov in sklepanja nismo uspeli pojasniti s pomočjo literature temveč ravno obratno. Namreč razvidno je, da lahko višje koncentracije fenolnih spojin, prisotne tudi v tatarski ajdi, celo negativno vplivajo na rast rastlin ali razvoj semen (Lannucci s sod. 2013). Raziskave na semenih soje (Colpas s sod. 2003) in semenih rastlin z rodu *Palicourea* kažejo inhibitorne učinke fenolnih spojin na rast rastlin oz. pri slednjem primeru sodelujejo pri dormanci semen (Inácio s sod. 2013). Negativni učinek rastlinskih metabolitov ugotovljen v omenjenih raziskavah bi lahko pripisali rezultatom rastnih testov, kjer opazimo krajše poganjke ob tretiranju z ekstraktom ajde v primerjavi z etanolom. Iz nekoliko dvomljivih podatkov o manjši povprečni masi suhih kalic tretiranih z ekstraktom ajde v primerjavi z raztopino etanola pa bi lahko sklepali na slabši privzem vode pod vplivom fitokemikalij iz ajde, saj pri primerjavi svežih mas kalic obdelanih z ekstraktom ajde ali raztopino etanola ni statistično značilne razlike. Alelopatske kemikalije, med drugim tudi tiste, ki so prisotne v ajdi, lahko negativno vplivajo na mnoge fiziološke spremembe kot so delitev in rast celic ter stanje vode v rastlinah (Szwed s sod. 2018), kar bi lahko pojasnilo inhibitorne rastne učinke ekstrakta ajde na rastline. Szwed s sod. (2019) so pojasnili, da ajda vsebuje mnogo alelopatsko aktivnih spojin, med katerimi inhibitorne učinke predpisujejo predvsem fenolnim spojinam, vendar pa bi bilo potrebnih več raziskav z očiščenimi ekstrakti ajde za boljši vpogled v vpliv njenih učinkovin na rast in razvoj rastlin ter privzem vode v celice.

Zaključki

Poskus je bil usmerjen v raziskovanje možnosti uporabe ekstrakta zrna tatarske ajde kot način biokontrole. Rezultati kažejo, da ekstrakt ne zmanjša števila glivnih okužb v primerjavi z etanolom, vendar zmanjša negativne vplive etanola na delež skaljenih semen in rast. Rezultati kažejo na potencialne pozitivne vplive molekul v ekstraktu na rast koruze. V nadaljnjih raziskavah bi lahko raziskali ali ima ekstrakt pozitivne vplive in kako bi jih dosegli brez zaviranja rasti zaradi etanola.

Literatura

- Brooks GT, Roberts T, 1999. Pesticide chemistry and bioscience: the food-environment challenge. Woodhead publishing, Sawston, UK.
- Butnor JR, Verrico BM, Vankus V, Keller SR, 2018. Ethanol exposure can inhibit red spruce (*Picea rubens*) seed germination. Seed Science and Technology 46, 2, <https://doi.org/10.15258/sst.2018.46.2.07>
- Chen Y, Althiab AR, Carrie E, Desbrosses G, Binder BM, Chervin C, 2020. Ethanol, at physiological concentrations, affects ethylene sensing in tomato germinating seeds and seedlings. Plant Science 291, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110368>
- Colpas FT, Ono EO, Rodrigues JD, Passos JRDS, 2003. Effects of some phenolic compounds on soybean seed germination and on seed-borne fungi. Brazilian Archives of Biology and Technology 46, 2, <https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000200003>
- Iannucci A, Fragasso M, Platani C, Papa R, 2013. Plant growth and phenolic compounds in the rhizosphere soil of wild oat (*Avena fatua* L.). Frontiers in Plant Science 4, 509, <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00509>
- Inácio MC, Moraes RM, Mendonça PC, Morel LJF, França SC, Bertoni BW, Pereira AMS, 2013. Phenolic Compounds Influence Seed Dormancy of *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae), a Medicinal Plant of the Brazilian Savannah. American Journal of Plant Sciences 4, 1, <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.41017>
- Kalinova J, Triska J, Vrchotova N, 2006. Distribution of vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). Journal of agricultural and food chemistry 54, 1:5330-5335.
- Mikulajová A, Šedivá D, Hybenová E, Mošová S, 2016. Buckwheat cultivars — phenolic compounds profiles and antioxidant properties. Acta Chimica Slovaca 9, 2, <https://doi.org/10.1515/acs-2016-0021>
- Miyoshi K, Sato T, 1997. The effects of ethanol on the germination of seeds of japonica and indica rice (*Oryza sativa* L.) under anaerobic and aerobic conditions. Annals of Botany 79, 4, <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0364>
- Pavlinjek N., Praček N., Stanovšek K., Žvanut S., 2022. Učinek ekstrakta iz semen ajde (*Fagopyrum tataricum*) na rast izbranih gliv. Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum 13, 1: v tisku
- Salehi MR, Ashiri F, Salehi H, 2008. Effect of Different Ethanol Concentrations on Seed Germination of Three Turfgrass Genera. Advances in Natural and Applied Sciences 2, 1:6-9.
- Sequeira SO, Phillips AJL, Cabrita EJ, Macedo MF, 2017. Ethanol as an antifungal treatment for paper: short-term and long-term effects. Studies in Conservation 62, 1, <https://doi.org/10.1080/00393630.2015.1137428>
- Simonetti G, Brasili E, Pasqua G, 2020. Antifungal Activity of Phenolic and Polyphenolic Compounds from Different Matrices of *Vitis vinifera* L. Against Human Pathogens. In Molecules 25, 16, <https://doi.org/10.3390/molecules25163748>
- Steinberg G, Gurr SJ, 2020. Fungi, fungicide discovery and global food security. Fungal Genetics and Biology 144, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103476>
- Szwed M, Wiczowski W, Szawara-Nowak D, Ralph LO, Marcin H,

2019. Allelopathic influence of common buckwheat root residues on selected weed species. *Acta Physiol Plant* 41, 92, <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2885-y>
16. Thind TS, 2021. Changing trends in discovery of new fungicides: a perspective. *Indian Phytopathology* 74:875–883, <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00411-6>.
17. Valle DL, Cabrera EC, Puzon JJM, Rivera WL, 2016. Antimicrobial activities of methanol, ethanol and supercritical CO₂ extracts of philippine Piper betle L. on clinical isolates of Gram positive and Gram negative bacteria with transferable multiple drug resistance. *PLoS ONE* 11, 1, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146349>
18. Yoon MY, Cha B, Kim JC, 2013. Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. *Plant Pathology Journal* 29, 1, <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.05.2012.0072>
19. Zhong L, Lin Y, Wang C, Niu B, Xu Y, Zhao G, Zhao J, 2022. Chemical Profile, Antimicrobial and Antioxidant Activity Assessment of the Crude Extract and Its Main Flavonoids from Tartary Buckwheat Sprouts. *Molecules* 27, 2, <https://doi.org/10.3390/molecules27020374>
20. Zhang K, He M, Fan Y, Zhao H, Gao B, Yang K, Li F, Tang Y, Gao Q, Lin T, 2021. Resequencing of global Tartary buckwheat accessions reveals multiple domestication events and key loci associated with agronomic traits. *Genome Biology* 22, 23.
21. Zhou X, Wen L, Li Z, Zhou Y, Chen Y, Lu Y, 2015. Advance on the benefits of bioactive peptides from buckwheat. In *Phytochemistry Reviews* 14, 3, <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9390-0>

Vpliv namakanja zrn prosa v cinkovem sulfatu na biofortifikacijo rastlin s cinkom

Kaja Adamek, Blaž Bajc, Nika Drnovšek, Zala Kink, Špela Rupnik

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

- Cink (Zn) je esencialen mikroelement v naši prehrani. Namen dela je bil raziskati vpliv biofortifikacije zrn dveh različnih populacij prosa (*Panicum miliaceum*) s cinkovim sulfatom (ZnSO_4) na kaljivost zrn in suho maso ter mineralno sestavo rastlin.
- Zrna prosa populacij Odranci in Sonček smo namakali v 50 mM raztopini ZnSO_4 . Izvedli smo test kaljivosti, 17 dni starim kalicam smo določili svežo in suho maso, v poganjkih in koreninah pa z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije izmerili koncentracije Zn, S, fosforja (P), klora (Cl), kalija (K), kalcija (Ca), mangana (Mn) in železa (Fe).
- Ugotovili smo, da obravnavanje s ZnSO_4 zmanjša kaljivost zrn pri populaciji Sonček, pri populaciji Odranci pa nanjo nima vpliva. Tretirane kalice so v nadaljnjem razvoju uspevale primerljivo s kontrolo. Z izjemo Fe in Mn pri Sončku se koncentracije ostalih elementov v poganjkih pri obeh populacijah niso statistično značilno razlikovale med tretmaji. V koreninah pa je tretiranje zrn s ZnSO_4 pri populaciji Sonček povišalo koncentracije vseh elementov, pri populaciji Odranci pa je bila povišana le koncentracija Zn.
- Namakanje zrn prosa se je izkazalo za učinkovit način biofortifikacije rastlin, vendar je bil vpliv namakanja pri eni od populacij večji kot pri drugi, prav tako pa je bilo povišanje koncentracij elementov v poganjkih manjše kot v koreninah. Zato bodo potrebne še nadaljnje študije za optimizacijo pristopa biofortifikacije rastlin prosa s Zn.

Ključne besede: biofortifikacija, proso, cink, kaljivost zrn, mineralna sestava kalic

Uvod

Zagotavljanje ustrezne mikrohranilne prehrane predstavlja velik izziv za skoraj polovico svetovnega prebivalstva, saj njihova hrana temelji pretežno na žitih. Ta so namreč revna v Fe, Zn, Ca, magneziju (Mg), bakru (Cu), jodu (I) in/ali selenu (Se) (White in Broadley 2009). S postopkom biofortifikacije bi lahko hranilno vrednost žit izboljšali (Vinoth in Ravindhran 2017). Biofortifikacija je postopek vnosa hranil v poljščino, ki zagotavlja razmeroma cenovno ugodno, trajnostno in dolgoročno sredstvo za zagotavljanje večje koncentracije mikrohranil. Trenutno poznamo tri najpogostejše pristope biofortifikacije: agronomsko, konvencionalno in transgeno. Agronomsko temelji na povečanju mikrohranil z uporabi gnojil ali povečanju njihove dostopnosti iz tal, konvencionalna na izboru in križanju najbolj obetavnih starševskih linij, transgene pa se poslužujemo, ko npr. želimo ojačati ali spremeniti transport elementov (Saltzman s sod. 2013).

Navadno proso (*Panicum miliaceum*) je enoletno žito. Izvira iz Kitajske. Poleg bisernega prosa (pearl millet) in indijske prosenke (finger millet) je eden izmed glavnih virov energije za ljudi v polsušnih regijah Azije in Afrike. Zrna prosa so okrogla, približno 3 mm dolga in 2 mm široka ter zaprta v gladko lupino. Proso zraste do višine od 30 do 100 cm, svoj življenjski cikel pa zaključi v 60 - 100 dneh (Habiyaremye s sod. 2016). Zaradi visoke vsebnosti različnih mineralov in aminokislin ter nizkega glikemičnega indeksa in brezglutenskih lastnosti je v zadnjem času postalo zanimivo za industrijo (Santra s sod. 2019).

Cink je eden izmed esencialnih elementov v človeški prehrani, saj je aktivator več kot 300 proteinov, sodeluje pri njihovem pravilnem zvižanju in pomaga uravnavati izražanje genov (Saper in Rash 2009). Ima pomembno vlogo pri razvoju in rasti tkiv, pri delovanju imunskega sistema, mineralizaciji kosti, strjevanju krvi in delovanju ščitnice. Pomanjkanje Zn tako povzroča upočasnen razvoj, nizek krvni pritisk, izgubo apetita, diarejo, izpadanje las in imunsko pomanjkljivost (Deshpande s sod. 2013). Pomanjkanje Zn pri ljudeh predstavlja svetovni problem. Značilnejše je za območja, kjer uživajo veliko žit in malo živalske hrane. Poleg same vsebnosti Zn v hrani je za absorpcijo pomembna tudi njegova biodostopnost. Fitinska kislina namreč močno veže Zn v zrnih in tako se tvori kompleks, ki zmanjša možnost njegove absorpcije v prebavilih. Fitinska kislina pa je glavna spojina za shranjevanje P v semenih rastlin, zlasti v žitih in stročnicah (Roohani s sod. 2013).

Namen naše raziskave je bil preučiti vpliv namakanja zrn prosa dveh populacij v raztopini $ZnSO_4$ na kaljivost, maso in mineralno sestavo rastlin. Postavili smo naslednje hipoteze: i) namakanje zrn ne bo vplivalo na odstotek kalitve, ii) masa rastlin, katerih zrna smo namakali v $ZnSO_4$, bo višja v primerjavi s kontrolo, iii) v rastlinah, katerih zrna smo namakali v $ZnSO_4$, bodo povečane koncentracije Zn in S, koncentracije ostalih elementov pa ne bodo spremenjene, in iv) proučevani populaciji (Sonček in Odranci) se bosta razlikovali v odzivu na namakanje.

Materiali in metode

Zrna prosa populacij Odranci in Sonček smo namočili v 50 mM raztopini $ZnSO_4$ oziroma v destilirani vodi (kontrolna skupina) pri sobni temperaturi za 7 ur in 20 min. Nato smo 100 zrn vsake od populacij prestavili v petrijevke z navlaženim filter papirjem (20 zrn na posamezno petrijevko,

5 petrijevk za posamezno populacijo in obravnavo) za oceno kaljivosti. Preostanek zrn smo razporedili po koritih z vlažno zemljo (Plantella). Vse smo postavili v rastno komoro s 16:8 fotoperiodo, kjer je bila temperatura 24°C čez dan in 20°C čez noč ter vlažnostjo 60 % in jih zalivali po potrebi. Po 5 dneh smo prešteli število skaljenih zrn v petrijevkah in ocenili kaljivost prosa. Po 17 dneh smo rastline vzeli iz korit, jih prešteli, ločili poganjke od korenin ter stehali njihovo svežo maso. Zamrznili smo jih v tekočem dušiku in jih prestavili v skrinjo na -90°C. Rastline smo sušili v liofilizerju (CoolSafe, LaboGene, Danska) do konstantne mase pri 0,001 mbar in -96°C. Posušene rastline smo stehali (suha masa) in material strli v terlnici. S pomočjo hidravlične stiskalnice smo iz materiala pripravili tabletko, v katerih smo izmerili koncentracijo Zn, S, P, Cl, K, Ca, Mn in Fe z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo po metodi, opisani v Nečemer s sod. (2008). Metoda temelji na emisiji sekundarnih (fluorescenčnih) žarkov iz elementov v preiskovanem materialu, ki je bil obsevan z visoko energijskimi rentgenskimi žarki. Rezultate smo prikazali na grafih in jih obdelali z dvosmerno analizo variance (ANOVA) s Tukey post-hoc testom in t-testom (razlike so statistično pomembne pri $p < 0,05$) v programu Statistica (StatSoft Inc., TIBCO Software Inc. California, USA).

Rezultati

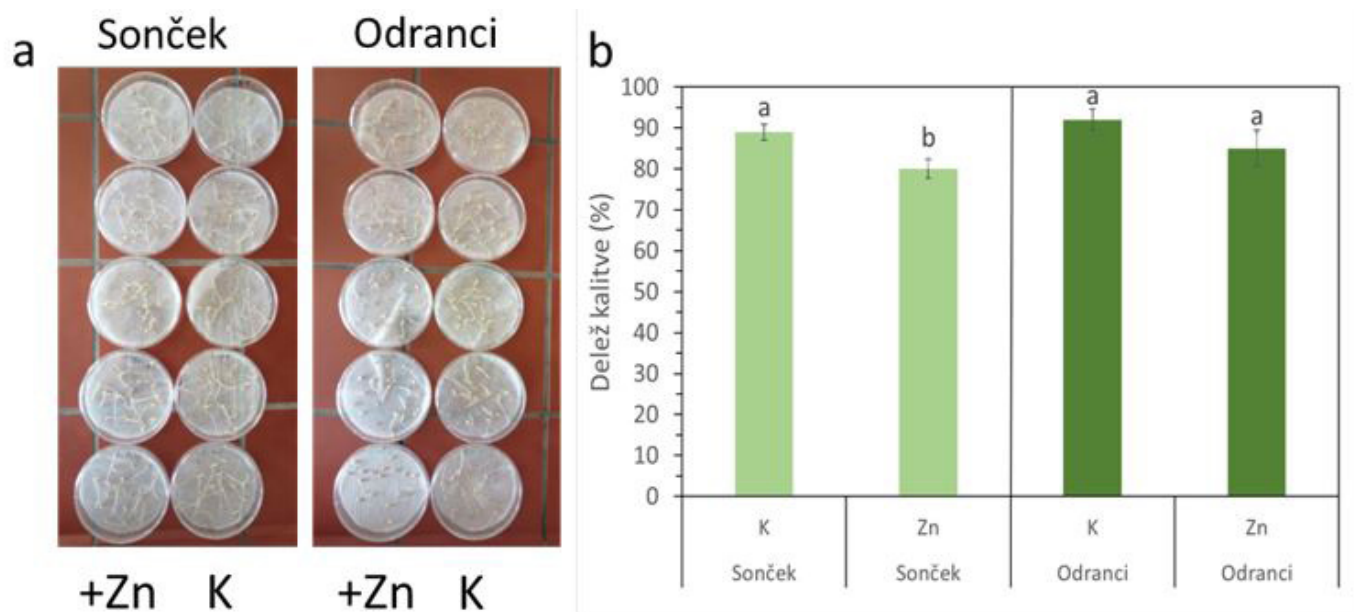
Delež kalitve je pri kontrolah višji kot pri zrnih, namočenih v $ZnSO_4$, pri populaciji Sonček, pri populaciji Odranci pa ni bilo značilnih razlik (Slika 1). Prav tako namakanje zrn v $ZnSO_4$ ni imelo statistično značilnega vpliva na suho maso poganjkov in korenin pri obeh populacijah (Slika 2). Povprečna suha masa poganjkov je znašala 7,00 mg, povprečna suha masa korenin pa 1,37 mg.

Pri obeh populacijah prosa smo zaznali statistično značilne razlike v koncentraciji Zn v koreninah med kontrolno skupino in skupino, ki je bila obravnavana s $ZnSO_4$ (Slika 3). Povprečna koncentracija Zn v koreninah kontrolnih rastlin je bila približno 1,6x nižja kot koncentracija v rastlinah, katerih zrna so bila namočena v $ZnSO_4$. Pri poganjkih pa statistične razlike v koncentraciji Zn med skupinami ni bilo.

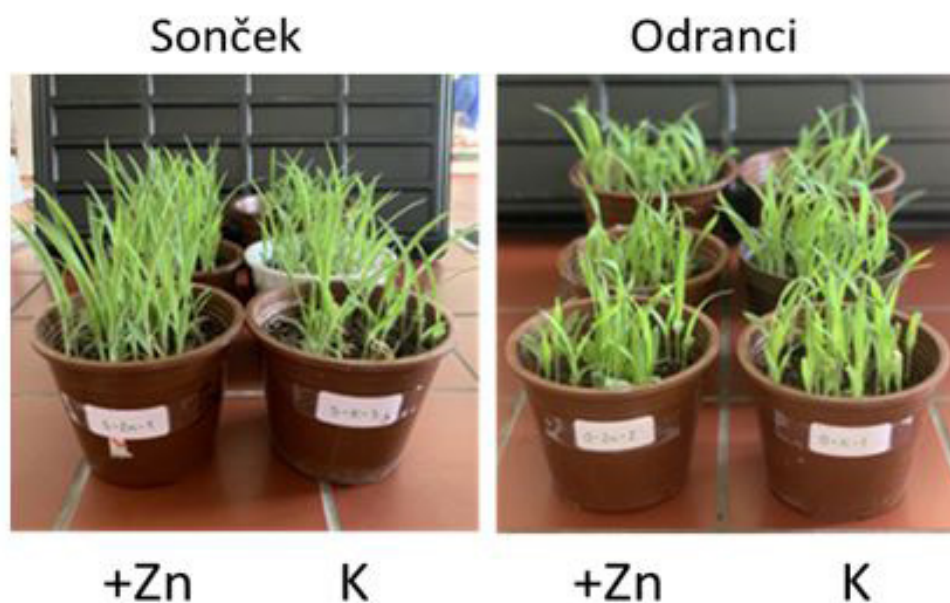
Izmerili smo tudi koncentracije P, S, Cl, K, Ca, Mn in Fe v suhi masi korenin in poganjkov. Koncentracija Fe v poganjkih kontrolne skupine populacije Sonček je bila statistično značilno višja kot v ostalih treh skupinah. Biofortifikacija ni imela statistično značilnega vpliva na koncentracijo P, S, K, Cl in Ca v poganjkih obeh populacij. Največjo koncentracijo Mn v poganjkih smo izmerili v kontrolni skupini pri populaciji Sonček, vendar je prišlo do statistično značilne razlike le med omenjeno skupino in populacijo Odrancev, ki so bili tretirani s Zn. Koncentracije vseh elementov (P, S, K, Cl, Ca, Mn in Fe) v koreninah rastlin Sonček, ki so bile tretirane s Zn, so bile statistično značilno višje kot koncentracije teh elementov v koreninah preostalih skupin (Slika 3).

Diskusija

Raziskav na temo biofortifikacije prosa s Zn, ki bi študirale vpliv namakanja zrn na kalitev, maso rastlin in vsebnost različnih mineralov v rastlinah prosa, nismo zasledili. Opravljenih pa je bilo nekaj podobnih študij na drugih rastlinah. Naši rezultati so v nasprotju z rezultati, ki so jih dobili Rehman s sod. (2015) z namakanjem zrn pšenice v raztopinah $ZnCl_2$ in $ZnSO_4$ (0,01 M,



Slika 1: Skaljena zrna dveh populacij prosa (Sonček in Odranci), katerih zrna smo 27 ur namakali ali v $ZnSO_4$ (+Zn) ali v destilirani vodi (K) pri sobni temperaturi (a) in delež kalitve teh zrn (b). Prikazana so povprečja \pm standardne napake ($n=5$). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike (dvosmerna ANOVA in Tukey post-hoc test pri $p < 0,05$).



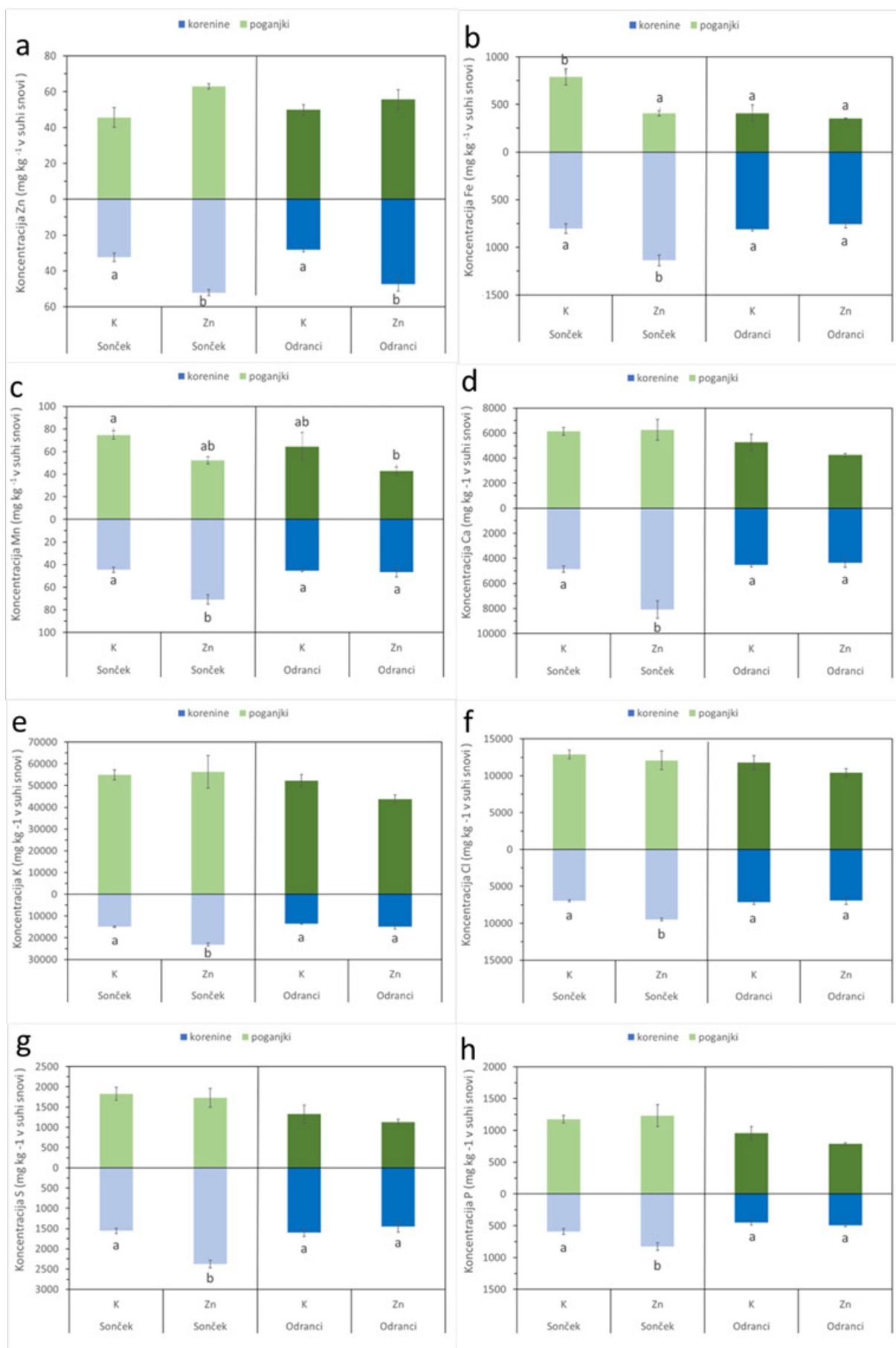
Slika 2: Fotografiji 27 dni starih rastlin prosa (Sonček in Odranci), katerih zrna smo 27 ur namakali ali v $ZnSO_4$ (+Zn) ali v destilirani vodi (K) pri sobni temperaturi.

0,05 M, 0,1 M, 0,5 M in 1 M). Biofortifikacija s $ZnSO_4$ je imela pozitiven vpliv na kalitev pšenice (tako na delež kot na hitrost kalitve), pri tem je bila najbolj učinkovita 0,5 M raztopina. S krajšim časom kalitve pa so korelirale tudi dolžine poganjkov, korenin in suha masa poganjkov, ki so se povečale. Izkazalo pa se je, da v primeru koncentracij $ZnSO_4$, ki so višje od 0,5 M, pride do negativnega vpliva na kalitev in rast poganjkov. Previsoka koncentracija Zn je za rastline strupena, saj lahko Zn zavira delitev celic. V našem primeru smo morda za populacijo Sonček uporabili preveč koncentrirano raztopino, kar je zaviralno vplivalo na kalitev.

Koncentracija Zn v koreninah prosa se je po namakanju zrn v raztopini $ZnSO_4$ povečala, medtem ko na koncentracijo Zn v poganjkih namakanje v raztopini $ZnSO_4$ ni imelo statistično

značilnega vpliva. V dosedanjih raziskavah biofortifikacije s Zn so dokazali, da namakanje zrn poviša koncentracijo Zn v rastlinah, vendar ni nobena izmed raziskav hkrati preučevala vpliva biofortifikacije v različnih delih rastlin in na različnih kultivarjih.

Lopez-Morales s sod. (2020) so z biofortifikacijo povišali koncentracijo Zn v zrnih kitajskega fižola, Zou s sod. (2014) pa so z namakanjem zrn v $ZnSO_4$ dosegli povišanje vsebnosti Zn v sojinah kalčkih. Chattha s sod. (2017) so uspešno zvišali vsebnost Zn v treh različnih kultivarjih pšenice. Kultivar in metoda nanosa Zn sta imela znaten vpliv na pridelek, koncentracijo Zn v zrnih in koncentracijo fitinske kisline v zrnih. Interakcije med kultivarjem in metodo nanosa so imele vpliv le na koncentracijo Zn v zrnih.



Slika 3: Koncentracija cinka (Zn; a), železa (Fe; b), mangana (Mn; c), kalcija (Ca; d), kalija (K; e), klora (Cl; f), žvepla (S; g) in fosforja (P; h) v koreninah in poganjkih 27 dni starih rastlin prosa, katerih zrna smo 27 ur namakali ali v destilirani vodi (K) ali v ZnSO_4 (+Zn) pri sobni temperaturi. Prikazana so povprečja \pm standardne napake ($n=3$). Proučevali smo dve populaciji prosa: Sonček in Odranci. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike (dvosmerna ANOVA in Tukey post-hoc test pri $p<0,05$).

Koncentracija Fe v biofortificiranih rastlinah populacije Sonček je bila nižja od koncentracije Fe v rastlinah sorte Sonček, ki so bile tretirane le z vodo. Podoben rezultat so dobili tudi Zhao s sod. (2011), ki so tretirali pšenico s Zn, kar je znižalo koncentracijo Fe, ni pa imelo vpliva na koncentracije Mn in Cu. Razlog za znižanje koncentracije Fe je lahko antagonizem med Fe in Zn, saj ta dva elementa tekmujeta za vezavo na iste transportne proteine (Rietra s sod. 2017). Li s sod. (2016) so dobili nasprotno rezultate, saj je foliaren nanos Zn in Fe zvišal koncentracije teh dveh elementov v pšenični moki. Možni vzroki za takšne razlike v rezultatih raziskav so okoljski dejavniki ali rastlinski genotipi (Liu s sod. 2017). Poleg tega odpiramo tudi možnost prisotnosti zemlje, ki je bogata z Fe, pri analizi korenin.

Analiza elementov je pokazala, da biofortifikacija ni vplivala na vsebnost P, S, K, Cl in Ca v poganjkih proučevanih populacij. Koncentracije P, S, K, Cl, Ca, Mn in Fe v koreninah rastlin Sonček, ki so bile tretirane s Zn, so bile višje kot v ostalih skupinah. V raziskavah na navadni rukvici in navadnem toličaku se koncentracije Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn in Sr v biofortificiranih rastlinah niso statistično razlikovale od koncentracij v kontrolah (D'Imperio s sod. 2022). V sojinah kalčkov se je koncentracija Ca v s Zn tretiranih rastlinah zvišala za 15 %, koncentracija Mg pa za 7,1 %. Kalčki, tretirani z Zn, in kalčki, tretirani z vodo, se niso razlikovali v koncentraciji Fe, Mn in Cu (Zou s sod. 2017).

Zaključki

Ugotovili smo, da namakanje zrn v $ZnSO_4$ zmanjša njihovo kaljivost pri populaciji Sonček, pri populaciji Odranci pa nanjo nima vpliva. Smiselno bi bilo preveriti vpliv različnih koncentracij raztopine $ZnSO_4$ na kaljivost za posamezno populacijo. Tretirane kalice so v nadaljnjem razvoju uspevale primerljivo s kontrolo - pri suhi masi kalčkov ni bilo statistično značilne razlike med kontrolnimi in obravnavanimi rastlinami. Z izjemo Fe in Mn pri Sončku se koncentracije vseh ostalih elementov v poganjkih pri obeh populacijah niso statistično značilno razlikovale med tretmaji. V koreninah pa je namakanje zrn v $ZnSO_4$ pri populaciji Sonček povišalo koncentracije vseh elementov, pri populaciji Odranci pa je bila povišana le koncentracija Zn.

S tem smo zavrnilo hipotezo i), torej da namakanje zrn ne bo vplivalo na odstotek kalitve. Zavrnilo smo tudi hipotezo ii), torej da bo masa rastlin, katerih zrna smo namakali v $ZnSO_4$, višja v primerjavi s kontrolo. Hipotezo iii) smo delno potrdili, saj je bila v rastlinah, katerih zrna smo namakali v $ZnSO_4$, res povečana koncentracija Zn, koncentracija S pa se ni povečala. Povečanje Zn smo sicer opazili zgolj v koreninah, zato bodo potrebne še nadaljnje študije za optimizacijo biofortifikacije rastlin. Prav tako so se spremenile koncentracije nekaterih ostalih elementov, česar nismo predvidevali. Hipotezo iv) smo potrdili, saj sta se proučevani populaciji razlikovali v odzivu na namakanje.

Zahvala

Raziskava je bila opravljena v okviru projekta J4-3091 in programa P1-0212, ki ju financira Slovenska agencija za raziskovalno dejavnost (ARRS).

Literatura

1. Chattha MU, Hassan MU, Khan I, Chattha MB, Mahmood A, Chattha MU, Nawaz M, Subhani MN, Kharal M, Khan S, 2017. Biofortification of wheat cultivars to combat zinc deficiency. *Frontiers in plant science* 8:281.
2. Deshpande J, Joshi M, Giri P, 2013. Zinc: the trace element of major importance in human nutrition and health. *International journal of medical science and public health* 2:1-6.
3. D'Imperio M, Montesano FF, Serio F, Santovito E, Parente A, 2022. Mineral composition and bioaccessibility in rocket and purslane after Zn biofortification process. *Foods* 11:484.
4. Habiyaremye C, Matanguihan JB, D'Alpoim Guedes J, Ganjyal GM, Whiteman MR, Kidwell KK, Murphy KM, 2017. Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) and its potential for cultivation in the Pacific Northwest, U.S.: A review. *Frontiers in Plant Science* 7:1961.
5. Liu D, Liu Y, Zhang W, Chen X, Zou C, 2017. Agronomic approach of zinc biofortification can increase zinc bioavailability in wheat flour and thereby reduce zinc deficiency in humans. *Nutrients* 9:465.
6. 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* 63:1240-1247.
7. Rehman A, Farooq M, Ahmad R, Basra SMA, 2015. Seed priming with zinc improves the germination and early seedling growth of wheat. *Seed Science & Technology* 43:262-268.
8. Rietra RPJ, Heinen M, Dimkpa CO, Bindraban PS, 2017. Effects of nutrient antagonism and synergism on yield and fertilizer use efficiency. *Communications in soil science and plant analysis* 48:1895-1920.
9. Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R, 2013. Zinc and its importance for human health: an integrative review. *Journal of research in medical sciences* 18:144-157.
10. Saltzman A, Birol E, Bouis HE, Boy E, De Moura FF, Islam Y, Pfeiffer WH, 2013. Biofortification: progress toward a more nourishing future. *Global Food Security* 2:9-17.
11. Santra DK, Khound R, Das S, 2019. Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) breeding: progress, challenges and opportunities. *Advances in plant breeding strategies: cereals* 5:223-257.
12. Saper RB, Rash R, 2009. Zinc: an essential micronutrient. *American Family Physician* 79:768.
13. Vinoth A, Ravindhran R, 2017. Biofortification in millets: a sustainable approach for nutritional security. *Frontiers in Plant Science* 8:29.
14. Zhao AQ, Bao QL, Tian XH, Lu XC, William JG, 2011. Combined effect of iron and zinc on micronutrient levels in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of environmental biology* 32:235-239.
15. 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* 94:3053-3060.

Primerjava učinkovitosti ekstraktov prave aloje (*Aloe vera*) in drevesaste aloje (*Aloe arborescens*) za zaviranje rasti izbranih vrst gliv

Blaž Režonja¹, Maša Drevenšek²

¹Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

²II. gimnazija Maribor, Program Mednarodne mature – IBO, Trg Miloša Zidanška 1, SI-2000 Maribor

- Namen raziskave je bil ugotoviti učinkovitost ekstrakta prave aloje (*Aloe vera*) in drevesaste aloje (*A. arborescens*) za zaviranje rasti izbranih vrst gliv izoliranih iz zrnja ajde (*Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Fusarium graminearum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* in *Epicoccum nigrum*).
- Iz listnega gela obeh aloj smo z ultrasonično homogenizacijo pripravili naravni ekstrakt ter ga dodali v sveža gojišča krompirjevega dekstroznega agarja. Na gojišča smo nacepili izbrane glive in po 4 dneh inkubacije začeli z meritvami površine gliv na 24 ur, 4 dni zapored.
- Pri večini glivnih vrst nismo opazili nobenih razlik ali zavrtja rasti gliv v prisotnosti ekstraktov aloj, kvečjemu smo pri določenih vrstah opazili celo nekoliko boljšo rast v primerjavi s kontrolo, kar pripisujemo vsebnosti ogljikovih hidratov, proteinov in drugih spojin, ki lahko delujejo celo ugodno na rast gliv.
- Naši naravni ekstrakti se torej niso izkazali za učinkovite zaviralce rasti, zato v prihodnje predlagamo izboljšave ekstrakcije in koncentracije vsebine gela aloj *Aloe vera* in *A. arborescens*.

Ključne besede: fitopatogeni, antimikotiki, *Alternaria*, *Fusarium*, *Epicoccum*

Uvod

Aloja (*Aloe* sp.) je sukulentna trajnica iz družine zlatokorenovk (Asphodelaceae), ki so večinoma razširjene po starem svetu. Znanih vrst je približno 140, med njimi pa so najbolj preučene *A. barbadensis*, *A. ferox*, *A. vera* in *A. arborescens* (Salehi in sod., 2018). Listi aloje, ki so najpogosteje uporabljen del rastline, imajo tri osnovne anatomske enote: zunanji zelen epidermis, zunanja pulpna regija pod epidermisom, kjer se nahajajo vaskularni snopi in od koder izvira grenak lateks, ter notranja pulpa, ki jo sestavljajo parenhimske celice in je t.i. "aloin gel," ki vsebuje širok spekter fitokemičnih spojin, med njimi alkaloide, antrakinone, antrone, kromone, kumarine, flavonoide in piranone, pa tudi veliko mukopolisaharida acemanana, ki tvori alojin gel (Dagne in sod., 2000).

Gel prave aloje naj bi posedoval ogromno lastnosti: protirakave, antioksidantske, protivnetne, imunomodulatorne, protičirne, protidiabetične, dermoprotektivne, bakteriecidne, viricidne in fungicidne. Slednje so uporabne tudi izven medicine, npr. za potrebe prehranske industrije in kmetijstva, domnevno pa naj bi te lastnosti pravi aloji dajalo sinergistično delovanje preko 200 različnih kemijskih spojin (Hamman, 2008). Primerjalna analiza listnih gelov osmih rastlin iz rodu *Aloe* je pokazala, da ima *A. arborescens* znatno višje koncentracije lipidov, proteinov in fenolov, pa tudi skupno hidrofилno in lipofilno antioksidantsko aktivnost kot *A. vera*, vendar skupna protiglivna učinkovitost zelo variira glede na uporabljeno testno glivo (Zapata in sod., 2013).

Rastlinske bolezni na letni ravni povzročajo globalno izgubo 10-15% vseh pridelkov za skupno več sto milijard dolarjev škode, pri čemer so glive odgovorne za 70-80% vseh bolezni (Chatterjee in sod., 2016). Nenehna želja po optimizaciji kmetijstva je privedla do ekstenzivne uporabe fungicidov, najpogosteje benzimidazolov, ditiokarbamatov, strobilurinov in azolov, slednji pa so v obliki triazolov daleč najpogostejši fungicidi. Zaradi neprimerne in posledično prekomerne rabe fungicidov se glivni patogeni s svojim plastičnim genomom in kratkim generacijskim časom uspešno prilagajajo na fungicide in hkrati s tem tudi medicinske antimikotike, kar se npr. v medicini že odraža v porastu pojavnosti okužb s prej človeku nenevarnimi rodovi, kot je tudi rod *Fusarium*, uporabljen v tej raziskavi, ter naraščanje odpornosti že znanih problematičnih rodov, kot je *Aspergillus* (Brauer in sod., 2016; Kang in sod., 2021).

To nedvomno upravičuje svetovni trend pospešenega iskanja novih učinkovitih pristopov k nadzoru glivnih patogenov, pri čemer se raziskovalne skupine poslužujejo nanodelcev, koristnih endofitskih gliv in tudi naravnih ekstraktov iz rastlin (Altintas in sod., 2013). Tudi ta raziskava se pridružuje trendu iskanja učinkovitega naravnega rastlinskega ekstrakta za zaviranje rasti širšega spektra kmetijsko pomembnih patogenih vrst gliv.

Materiali in metode

Rastlinski material

Liste prave aloje (*Aloe vera*) in drevesaste aloje (*A. arborescens*) smo pridobili na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Rasle so pri sobnih pogojih, na približno 25 °C, ob oknu.

Sevi gliv

Uporabili smo glivne vrste *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium graminearum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum* in *F. sporotrichioides*, pridobljene iz glivne banke Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin. Za potrebe poskusa smo jih en teden prej vzgajali v svežih kulturah na ploščah krompirjevega dekstroznega agarja (PDA) v temi pri sobni temperaturi (25 °C).

Potek poskusa

Za pripravo ekstraktov smo uporabili približno 200 g listov vsake rastline. Liste smo odrezali s skalpelom, nato pa jih površinsko sterilizirali tako, da smo jih za 3 minute namočili v 96 % etanol in nato dobro sprali z avtoklavirano destilirano vodo. Liste smo nato razrezali s skalpelom, iz njih postrgali gel in ga zmacerirali v terilnici ter pridobljen ekstrakt dokončno obdelali v ultrasoničnem homogenizatorju za 20 minut. Kontrolno gojišče smo pripravili tako, da smo zatehtali 15 g PDA, 5 g tehničnega agarja, 35 µg kloramfenikola in dodali 700 mL destilirane vode. Za testna gojišča z ekstraktom smo zatehtali enako količino prej omenjenih sestavin ter jim dodali 665 mL destilirane vode. Vsa gojišča smo avtoklavirali pri 121 °C za 20 minut in nato testnim gojiščem nato dodali 35 mL ekstrakta prave aloje ali drevesaste aloje, taka da smo dobili 5 % gojišča ekstrakta.

Vsako izmed 7 gliv smo nacepili na 5 plošč z vsakim od ekstraktov in na 7 kontrolnih plošč (uporabili smo petrijevke premera 90 mm). Za vsako ploščo smo s spatulo izrezali kvadratni košček gojišča z aktivno rastočim micelijem (stranica 7 mm) in ga položili na sredino plošče. Plošče smo nato inkubirali v temi pri sobni temperaturi (25 °C). Po 4 dneh inkubacije smo plošče na 24 ur fotografirali in z računalniško analizo fotografij v programskem okolju ImageJ ovrednotili velikost glivnih kolonij, pri čemer smo za mero vzeli površino fotografirane kolonije.

Statistična analiza

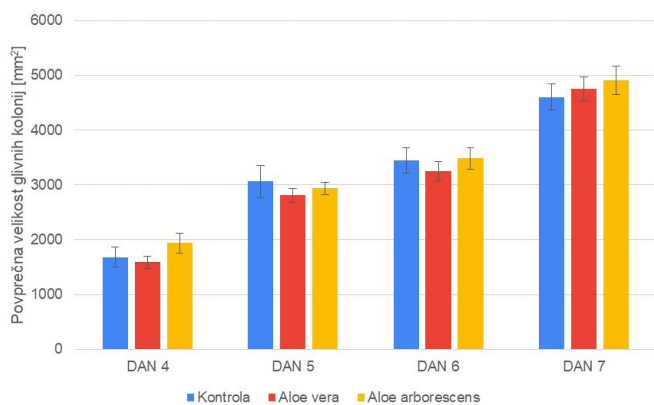
Pridobljene podatke smo obdelali v programu Statistica StatSoft 14, kjer smo izračunali povprečje, standardno napako in opravili enosmerno analizo variance (ANOVA). V primeru statistično značilnih razlik smo opravili še Dunn-Sidakov post-hoc test. Kot statistično pomembne smo smatrali razlike pri $p < 0,05$. Za grafični prikaz pridobljenih podatkov smo uporabili Microsoft Office Excel 2016.

Rezultati

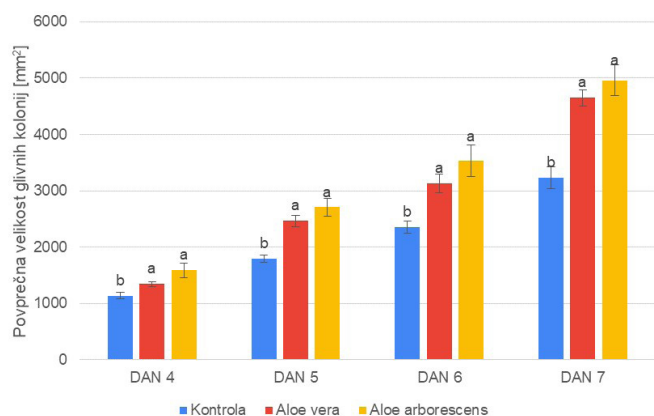
Rezultati rasti glive *Alternaria alternata* na Sliki 1 prikazujejo, da noben izmed testiranih ekstraktov ni imel vpliva na rast te vrste, saj nismo opazili statistično značilnih razlik med glivami, ki so rastle na različnih gojiščih.

Pri vrsti *Alternaria infectoria*, smo opazili celo značilno boljšo rast na gojiščih z ekstrakti obeh aloj v primerjavi s kontrolo (Slika 2). V tem primeru je gliva na obeh ekstraktih rasla bolje, razlika med kontrolo in gojišči z ekstraktoma aloj se je z vsakim dnem še povečevala.

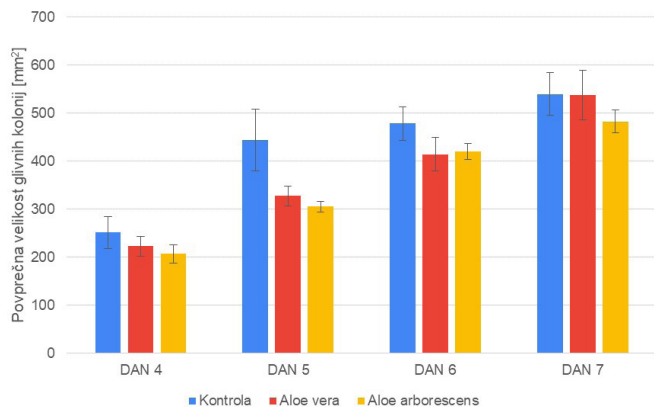
Saprofitska gliva *Epicoccum nigrum* je nasploh rastla bistveno počasneje od ostalih proučevanih fitopatogenih gliv, razlik v rasti med kontrolno skupino in ekstrakti pa nismo opazili (Slika 3).



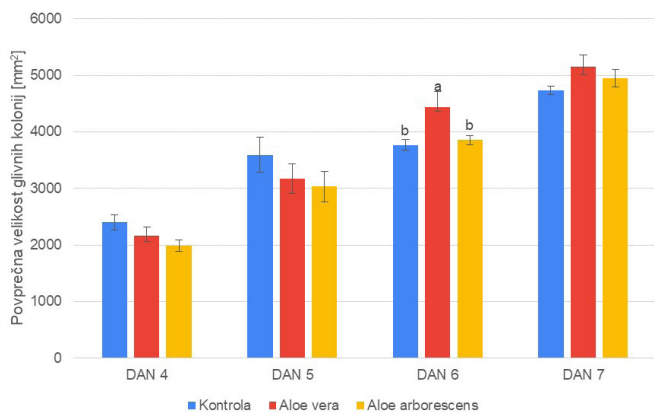
Slika 1: Dinamika rasti glive *Alternaria alternata* med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka površin glive na kontrolnem gojišču ($n = 7$) in testnih gojiščih z ekstraktom *Aloe vera* oziroma *A. arborescens* (za vsako $n = 5$) za vsak dan opazovanja.



Slika 2: Dinamika rasti glive *Alternaria infectoria* med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka površin glive na kontrolnem gojišču ($n = 7$) in testnih gojiščih z ekstraktom *Aloe vera* oziroma *A. arborescens* (za vsako $n = 5$) za vsak dan opazovanja. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike med skupinami za vsak dan.



Slika 3: Dinamika rasti glive *Epicoccum nigrum* med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka površin glive na kontrolnem gojišču ($n = 7$) in testnih gojiščih z ekstraktom *Aloe vera* oziroma *A. arborescens* (za vsako $n = 5$) za vsak dan opazovanja.



Slika 4: Dinamika rasti glive *Fusarium fujikuroi* med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka površin glive na kontrolnem gojišču ($n = 7$) in testnih gojiščih z ekstraktom *Aloe vera* oziroma *A. arborescens* (za vsako $n = 5$) za vsak dan opazovanja. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike med skupinami za vsak dan.

V primeru glive *Fusarium fujikuroi*, katere podatke prikazuje Slika 4, nismo opazili statistično značilnih razlik, razen na šesti dan, kar je morebiti posledica majhnega numerusa ali zgolj naključje. Na šesti dan meritev so glive na gojiščih z ekstraktom prave aloje rastle bolje kot na kontrolnih gojiščih ali gojiščih z ekstraktom drevesaste aloje.

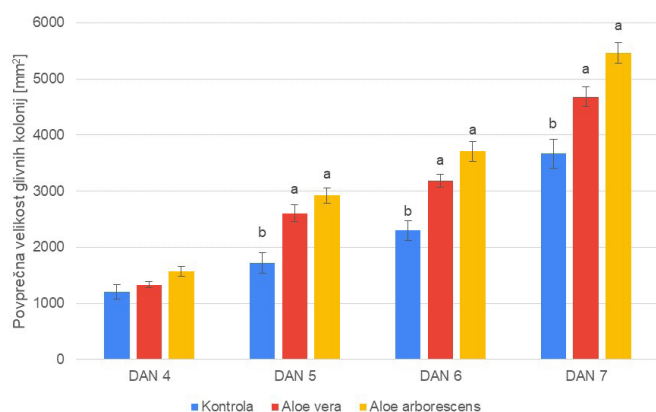
Podobno kot pri vrsti *A. infectoria* smo tudi v primeru glive *F. graminearum* opazili boljšo rast na gojiščih z ekstraktoma glede na kontrolo (Slika 5). Razlike so bile statistično značilne na vse dni razen na prvi dan meritev oz. četrti dan po začetku inkubacije.

Za razliko od *F. graminearum* smo pri vrsti *F. oxysporum* opazili razlike le na zadnji dan opazovanja, ko je ta najbolj rastla na gojišču z ekstraktom prave aloje, medtem ko se rast na ekstraktu drevesaste aloje ni razlikovala od kontrole (Slika 6). Gliva *F. sporotrichioides* je nasploh rastla najhitreje od vseh izbranih vrst gliv (Slika 7). Podobno kot pri vrsti *F. oxysporum* razlik med kontrolo ter ekstraktoma prave aloje in drevesaste

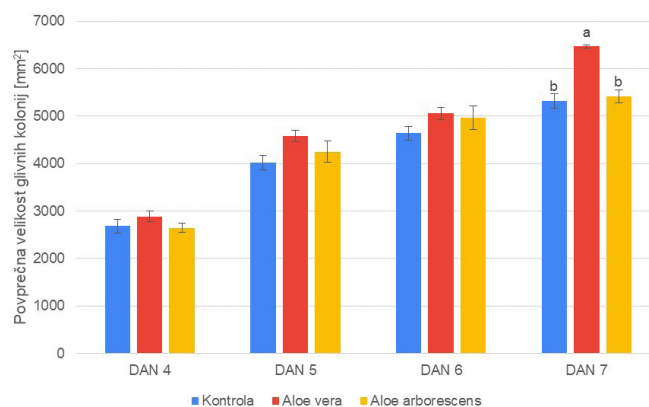
aloje nismo opazili z izjemo zadnjega, sedmega dne meritev, ko je bila rast te glive boljša na gojiščih z dodanima ekstraktoma aloj. Na zadnji dan meritev so glive na slednjih gojiščih dosegle zelo veliko površino razrasti, primerljivo le s *F. oxysporum*.

Diskusija

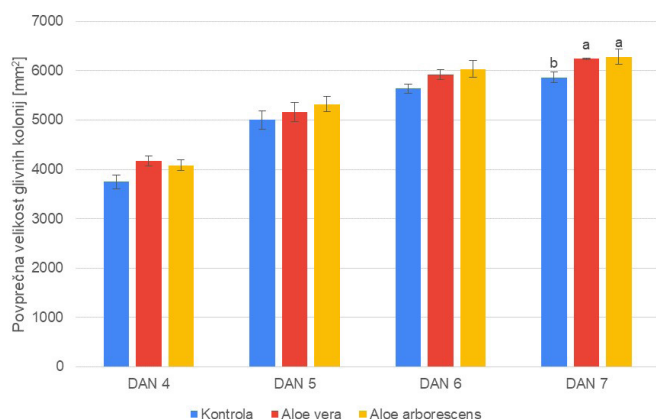
Znano je, da so za uspešno rast gliv najbolj kritični faktorji zadostna količina kisika, dovolj visoka temperatura in dovolj dostopne vode, pri čemer glive favorizirajo okolja z vodno aktivnostjo (aw) čim bližje 1, po navadi nad 0,9 (Morrell in Zabel, 2020). Ker je te faktorje praktično nemogoče omejevati brez škode rastlinam, je nujno najti biološko sprejemljive kemične agense, ki bi zavirali rast gliv. V primeru uporabe ekstraktov prave in drevesaste aloje ciljamo predvsem na njune sekundarne metabolite, ki so se izkazali kot najmočnejši antimikotiki in proti bakterijska sredstva kot so denimo antrakokinoni (Garcia-Sosa in sod., 2006),



Slika 5: Dinamika rasti glive *Fusarium graminearum* med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka površin glive na kontrolnem gojišču (n = 7) in testnih gojiščih z ekstraktom *Aloe vera* oziroma *A. arborescens* (za vsako n = 5) za vsak dan opazovanja. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike med skupinami za vsak dan.



Slika 6: Dinamika rasti glive *Fusarium oxysporum* med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka površin glive na kontrolnem gojišču (n = 7) in testnih gojiščih z ekstraktom *Aloe vera* oziroma *A. arborescens* (za vsako n = 5) za vsak dan opazovanja. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike med skupinami za vsak dan.



Slika 7: Dinamika rasti glive *Fusarium sporotrichioides* med četrtem in sedmim dnevom inkubacije. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna napaka površin glive na kontrolnem gojišču (n = 7) in testnih gojiščih z ekstraktom *Aloe vera* oziroma *A. arborescens* (za vsako n = 5) za vsak dan opazovanja. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike med skupinami za vsak dan.

dihidroksiantrakokinoni (Wu in sod., 2006) in saponini (Reynolds in Dweck, 1999).

V naši raziskavi nismo opazili zavrtja rasti pri nobeni od izbranih vrst gliv. V primerih saprofitske glive in nekrotrofa rastlin *A. alternata*, ki pogosto okužuje ekonomsko pomembne rastline in proizvaja mikotoksine, nismo opazili nobenega učinka na njeno rast (Wang in sod., 2020). Prav tako nismo opazili učinka ekstraktov aloje na rast *E. nigrum*, ki je saprofit, oportunistični patogen, fakultativni endosimbiont in antagonist določenih fitopatogenih gliv in ščiti koreninske sisteme (Ogórek in sod., 2020). Podobno velja tudi za rastlinskega in človeškega patogena, ki povzroča riževo bolezen bakanae in številne bolezni na drugih ekonomsko pomembnih rastlinah, *F. fujikuroi* (Cen in sod., 2020). V vseh treh omenjenih primerih ni bilo statistično značilnih razlik v vseh štirih dnevih opazovanja, razen pri glivi *F. fujikuroi* na 6. dan, kar je verjetno posledica naključja oziroma majhnega numerusa. Možno je tudi, da smo z meritvami začeli prepozno, saj so po štirih dneh inkubacije glive že postale manj občutljive na ekstrakta. Ta

fenomen zmanjšanja občutljivosti sicer variira med različnimi vrstami in ga lahko pripišemo hitro pridobljeni odpornosti na celičnem nivoju preko encimske alteracije sestave antimikotika, povečane ekspresije specializiranih izvoznih transporterjev in aktivacije stresnih odzivov preko genomske plastičnosti (Revie in sod., 2018), sicer pa o podobnih pojavih pri teh specifičnih glivah poročajo tudi drugi raziskovalci, ki so opravljali podobne eksperimente z ekstrakti drugih rastlin (Pavlinjek in sod., 2022). Posebej v primeru *E. nigrum* je delovanje ekstraktov dvomljivo tudi s stališča, da je ta gliva v eksperimentu rastle znatno počasneje od ostalih vrst, kljub virom, ki njeno rast umeščajo med hitrejše. V 2 dneh naj bi pri sobni temperaturi kolonija dosegla premer 6 cm (Anderson in sod., 1981), pri tem eksperimentu pa težko govorimo o premeru nad 4 cm po 7 dneh inkubacije.

Pri ostalih glivah, torej pri *A. infectoria*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* in *F. sporotrichioides*, je prišlo celo do izboljšane rasti na ekstraktih aloje glede na kontrolna gojišča. Največje izboljšanje rasti smo opazili pri vrstah *A. infectoria* in *F. graminearum*, kjer se razlika med kontrolo in gojišči z ekstrakti z vsakim dnevom meritve povečuje. V primerih gliv *F. oxysporum* in *F. sporotrichioides* smo statistično značilne razlike v rasti opazili šele na zadnji, sedmi dan eksperimenta. Boljšo rast teh gliv na gojiščih, ki so vsebovala ekstrakt aloje, lahko potencialno pripišemo sestavi gela aloje: dokazano je namreč bilo, da vsebuje 98,5% vode, preostalih 1,5% pa vsebuje vodotopne in maščobotopne vitamine, minerale, encime, polisaharide, fenole in organske kisline (Hamman, 2008). Med bolj izstopajoče ogljikove hidrate, ki so lahko koristna hrana za glive, spadajo polisaharidi galaktan, ksilan in celuloza, prav tako pa monosaharidi manoza, glukoza, L-ramnoza in aldopentoza, od proteinov pa je prisoten pektin. Polisaharidi poleg vode namreč predstavljajo večinski delež snovi v parenhimu tako prave aloje kot drevesaste aloje (Hamman, 2008), zato ni presenetljivo, da so glive lahko uspešneje rastle na gojiščih z ekstraktoma. Z dodajanjem ekstrakta in priprave takih gojišč 5% koncentracije je glivam zagotovljene več proste vode, kar zviša vodno aktivnost rastnega medija, obenem pa z dodatnimi ogljikovimi hidrati, proteini in vitamini obogatimo izhodiščno rastišče krompirjevega dekstroznega agarja. Glede na naše

rezultate, je težko primerjati učinkovitost ekstraktov obeh aloj in podati smiselno primerjavo med njima, saj v nobenem primeru ni prišlo do zavrtja rasti gliv. Prav tako pa tudi v primerih, ko je prišlo do izboljšane rasti izbranih gliv, večinoma nismo opazili razlik med obema ekstraktoma.

Vredna omembe je tudi metoda priprave ekstrakta, saj ima več kot očitno način priprave ekstrakta iz gela aloj ključen vpliv na končno učinkovitost ekstrakta pri zaviranju rasti gliv. Večina študij se poslužuje hidroalkoholnih ali alkoholnih ekstraktov, izjemno učinkovitost so dokazali tudi pri uporabi acetonskih ekstraktov (Sitara in sod., 2011). Že izredno majhne koncentracije (pod 0,5%) so povsem zavrle rast več rodov gliv, med drugim tudi vrste *A. alternata*, ki smo jo uporabili v tej raziskavi. Glede na dejstvo, da smo uporabili vsaj 10× večjo koncentracijo ekstrakta, a nismo dosegli nobenega zavrtja rasti gliv, je možno, da naš način priprave ekstrakta ni učinkovito izoliral in skoncentriral proti glivne učinkovine, obenem pa nismo odstranil snovi, ki spodbujajo rast fitopatogenih gliv. Skoraj vsi hranljivi polisaharidi in proteini ob pripravi alkoholnih ekstraktov namreč ostanejo v netopnih odpadkih, ki se zlahka odfiltrirajo (Hamman, 2008), naši naravni ekstrakti pa so bili samo ročno macerirani in ultrasonično homogenizirani, kar je obdržalo vse te snovi v ekstraktu. Prav tako smo s to metodo obdržali vso vodo, ki je lahko dodatno spodbujala rast gliv. Upoštevač ta dejstva, bi bilo v prihodnjih raziskavah nujno spremeniti postopek pridobivanja ekstrakta in doseči višjo koncentracijo aktivnih sestavin iz gela, hkrati pa odstraniti snovi, ki lahko spodbujajo rast gliv, za kar se učinkovito uporabi ultrafiltracija skozi membrano cirkonijevega dioksida (Baek in sod., 2008).

Zaključek

Nenehni poskusi odkrivanja načinov okolju prijazne zaščite ekonomsko pomembnih rastlin so pripeljali do številnih koristnih organizmov, kot so različne žuželke, pršice, ogorčice, glive, virusi in bakterije. Priprava učinkovitih rastlinskih ekstraktov, ki bi uspešno zavirali rast fitopatogenih gliv, je precej zahtevna, saj se je za to treba poslužiti sorazmerno kompleksnih ekstrakcijskih in koncentracijskih metod, obenem pa se pri tem uporabljajo kemične snovi, ki so že same po sebi lahko okolju nevarne. V našem poskusu pridobivanja učinkovitega proti glivnega ekstrakta iz navadne in drevesaste aloje se je izkazalo, da pri naravni pripravi ekstrakta ohrani preveč snovi, ki rast gliv neposredno spodbujajo. Večina glivnih vrst je namreč celo bolje rastla na ekstraktu obeh aloj, z izjemo vrst *A. alternata* in *E. nigrum*, kjer nismo opazili razlik v rasti na ekstraktih obeh aloj. Rezultati naše raziskave kažejo na to, da bi za zatiranje ekonomsko problematičnih gliv z uporabo ekstraktov aloj verjetno morali spremeniti oziroma izbrati drug postopek ekstrakcije ter nadaljnje koncentracije gela.

Literatura

- Altintas A., Tabanca N., Tiyhak E., Ott P.G., Moricz A.M., Mincsovcics E., Wedge D.E. 2013. Characterization of volatile constituents from *Origanum onites* and their antifungal and antibacterial activity. *Journal of AOAC International*, 96, str. 1200–1208, doi: 10.5740/jaoacint.SGEAltintas
- Anderson K.H., Domsch W., Gams Traute-Heidi. 1981. *Compendium of soil fungi*. London: Academic Press. ISBN 978-0-12-220401-2.
- Baek Jin-hong, Kim Sung-A, Lee Shin-Young. 2008. Concentration of Fresh Gel from *Aloe vera* L. by Using Ultrafiltration Process. *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 23(2), str. 169–176.
- Brauer V.S., Rezende C.P., Pessonni A.M., De Paula R.G., Rangappa K.S., Nayaka S.C., Gupta V.K., Almeida F. 2019. Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. *Biomolecules*, 9(10):521, doi: 10.3390/biom9100521
- Cen Y.K., Lin J.G., Wang Y.L., Wang J.Y., Liu Z.Q., Zheng Y.G. 2020. The Gibberellin Producer *Fusarium fujikuroi*: Methods and Technologies in the Current Toolkit. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:232, doi: 10.3389/fbioe.2020.00232
- Chatterjee S., Kuang Y., Splivallo R., Chatterjee P., and Karlovsky P. 2016. Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology* 16, str. 83–83. doi: 10.1186/s12866-016-0698-3
- Dagne E., Bisrat D., Viljoen A., Van Wyk B. 2000. Chemistry of aloe species. *Current Organic Chemistry* 4, str. 1055–1078, doi: 10.2174/1385272003375932
- García-Sosa K., Villarreal-Alvarez N., Lubben P., Pena-Rodríguez L.M. 2006. Chrysophanol, an antimicrobial anthraquinone from the root extract of *Colubrina gregii*. *Journal of Mexican Chemical Society*, 50(2): 76–78.
- Hamman Josias H. 2008. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules*, 13, str. 1599–1616, doi: 10.3390/molecules13081599
- Kang S.E., Sumabat L.G., Melie T., Mangum B., Momany M., Brewer M.T. 2021. Evidence for the agricultural origin of resistance to multiple antimicrobials in *Aspergillus fumigatus*, a fungal pathogen of humans. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 12, 2, doi: 10.1093/g3journal/jkab427
- Morrell Jeffrey J., Zabel Robert A. 2020. Chapter Four - Factors affecting the growth and survival of fungi in wood (fungal ecology). *Decay and Its Prevention*, str. 99–128, doi: 10.1016/B978-0-12-819465-2.00004-8
- 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, doi: 10.3390/plants9121691
- Pavlinjek Natalija, Praček Neža, Stanovšek Katja, Žvanut Samuel. 2022. Učinek ekstrakta iz semen tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) na rast izbranih vrst gliv. *Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum*, 13 (1), str. 34–39.
- Revie M. Nicole, Iyer Kali R., Robbins Nicole, Cowen Leah E. 2018. Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms and Impact. *Current Opinions in Microbiology* 45, str. 70–76, doi: 10.1016/j.mib.2018.02.005
- Reynolds T., Dweck A. C. 1999. *Aloe vera* leaf gel: or review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 68: 3–37.
- Salehi B., Albayrak S., Antolak H., Kreigel D., Pawlikowska E., Sharifi-Rad M., Uprety Y., Fokou P. V. T., Yousef Z., Zakaria Z. A., Varoni E. M., Sharopov F., Martins N., Iriti M., Sharifi-Rad J. 2018. *Aloe* Genus Plants: From Farm to Food Applications and Phytopharmacotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2843, doi: 10.3390/ijms19092843
- Sitara Uzma, Hassan Nusrat, Naseem Jawed. 2011. Antifungal activity of *Aloe vera* gel against plant pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Botany*, 43(4).
- Wang R., Zhao P., Ge X., Tian P. 2020. Overview of *Alternaria alternata* Membrane Proteins. *Indian Journal of Microbiology* 60(3):269–282, doi: 10.1007/s12088-020-00873-8
- Wu, Y.W., Ouyang J., Xiao X. H., Gao Y. W., Liu Y. 2006. Antimicrobial properties and toxicity of anthraquinones by microcalorimetric bioassay. *Chinese Journal of Chemistry* 24: 45–50.
- Zapata P., Navarro D., Guillén F., Castillo S., Martínez-Romero D., Valero D., Serrano M. 2013. Characterisation of gels from different *Aloe* spp. As antifungal treatment: Potential crops for industrial applications. *Industrial Crops and Products*, 42, str. 223–230, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.06.002

Erratum - popravek članka iz Vol. 13, Št. 1

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 (Praharaj 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 (Praharaj 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 poganjkih 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 obravnava 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 obravnave 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

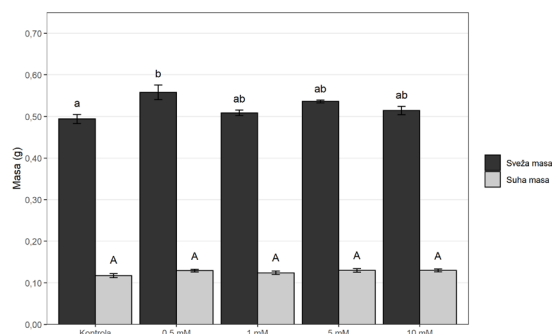
V preliminarnem poskusu, ko smo semena 24 ur namakali v destilirani vodi in naraščajočih koncentracijah cinkovega klorida (0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM), je večina semen zgnila, zato smo poskus ponovili tako, da smo semena namakali le 3 ure. Procent kaljivosti je bil v primerjavi s preliminarnim poskusom 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 obravnava pa je bila kaljivost manjša. (Tabela 1).

Sveža in suha masa kalic

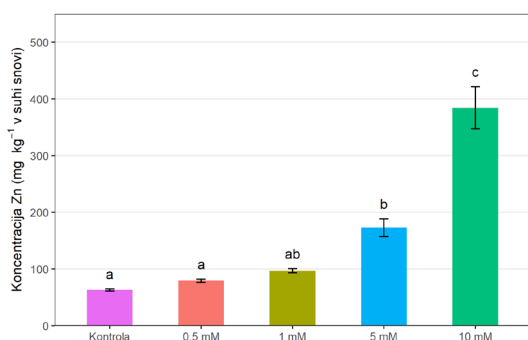
Statistično značilna razlika v sveži masi kalic je bila le med kontrolnimi kalicami ter kalicami katerih semena smo namakali

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

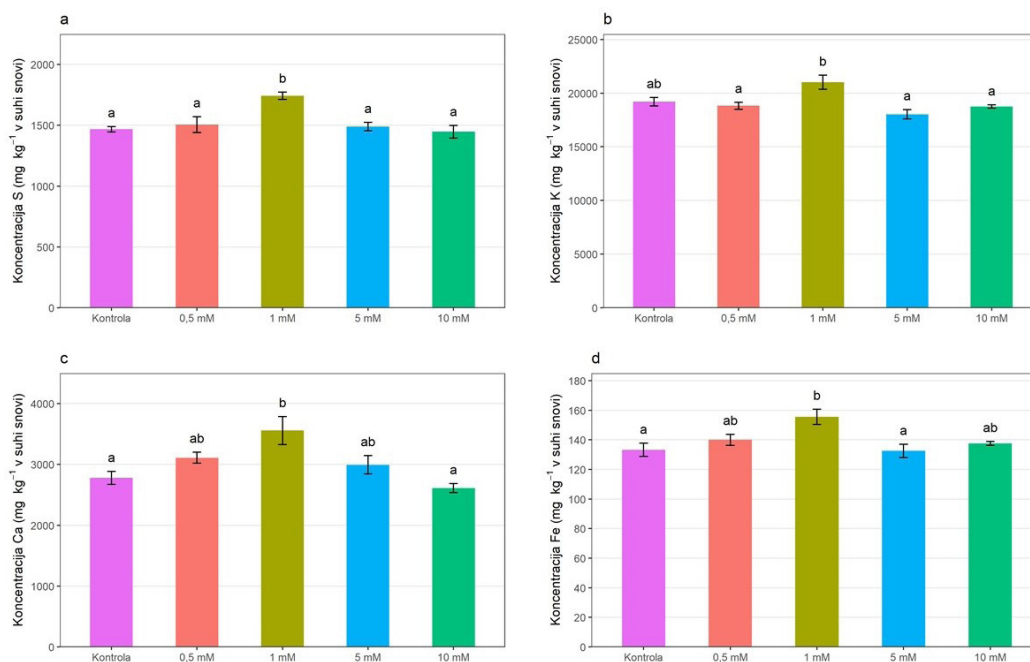
od kalic, katerih semena so bila namočena v 5 mM in 10 mM raztopino cinkovega klorida, med kontrolo in ostalima dvema obravnavama pa statistično značilne razlike v koncentracijami Zn ni bilo. Največjo spremembo koncentracije Zn smo opazili med kalicami pri obravnavah 5 mM in 10 mM cinkovega klorida, 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 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),



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 $p < 0,05$.

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 $100 \mu g mL^{-1} ZnSO_4$, kaljivost nad 97 %. Bolj uspešno rast 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 $384,5 \pm 37,1 mg kg^{-1}$ (pri $n = 4$), kar je šestkratno 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, obravnavanih z najvišjo koncentracijo cinkovega klorida zrasle 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

- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A, 2007. Zinc in plants. *New phytologist* 173(4): 677-702.
- Cousins RJ, McMahan RJ, 2000. Integrative aspects of zinc transporters. *The journal of nutrition* 130(5):2384S-1388S.
- Gibson RS, Ferguson EL, 1998. Nutrition intervention strategies to combat zinc deficiency in developing countries. *Nutrition research reviews* 11(1):115-31.
- 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.
- 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.
- 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.
- Liu K, 1997. Chemistry and nutritional value of soybean components. *Soybeans* 25-113.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.